

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**

**Fisiología espermática, fragmentación del ADN y  
niveles de expresión génica de Prm1, Prm2, Tnp1 y  
Tnp2 en relación a la edad en ratones**

**TESIS**

**Para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo**

**AUTOR**

**Jonathan Humberto Vásquez Cavero**

**Lima – Perú**

**2012**

A mis padres

Norma y Flavio

por su amor infinito

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Norma y Flavio, quienes durante toda mi vida me brindaron a mí y a mis hermanos todo su apoyo y aliento. Uds. son mis verdaderos mentores y por quienes deseo ser alguien mejor.

A mis hermanos, cuyo apoyo en los momentos más difíciles hizo posible este trabajo de investigación.

A la Prof. MSc. Martha Valdivia Cuya, responsable del laboratorio de “Fisiología de la Reproducción Animal” por aceptar ser mi asesora de tesis, por sus consejos y por permitirme dar mis primeros pasos en el campo de la investigación.

A la Prof. Dra. Mayra Elena Ortiz D’Avila Assumpção, responsable del laboratorio de “Fecundación in Vitro, Clonaje y Transgenia Animal” de la Universidad de Sao Paulo-Brasil, que me permitió desarrollar la presente tesis en su laboratorio, brindándome todo el apoyo logístico y científico necesario. Gracias por su confianza y amistad.

A la Dra. Camilla Mota Mendes quien me brindó todo su conocimiento y ayuda, no sólo durante el desarrollo de la presente tesis sino durante toda mi pasantía.

A mis amigos del Laboratorio de “Fecundación in Vitro Clonaje y Transgenia Animal” y del Laboratorio de “Semen y Andrología” quienes generosamente me ayudaron durante el desarrollo de la presente tesis, su ayuda fue fundamental, además sus buenas vibras y amistad brindada me hicieron sentir siempre como en casa.

A mis amigos del laboratorio de “Fisiología de la Reproducción Animal” y del laboratorio de “Reproducción y Biología del Desarrollo”.

A los profesores: Dra. Rina Ramírez, Dr. Alvaro Marcelo y Blgo. José Pino por aceptar ser mis revisores de tesis y ayudarme a mejorar la misma.

A todas las personas que de una u otra manera me ayudaron a cumplir esta meta, muchas gracias.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1 Edad y fertilidad masculina	3
1.2 Fragmentación del ADN espermático	7
1.3 Estrés oxidativo	10
1.4 Proteínas nucleares espermáticas	11
1.4.1 Protaminas	11
1.4.2 Proteínas de Transición Nuclear	13
1.4.3 Compactación del ADN espermático	15
1.4.4 Niveles de protaminación espermática	17
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
2.1 Hipótesis	18
2.1.1 Hipótesis Nula ( $H_0$ )	18
2.1.2 Hipótesis Alternativa ( $H_1$ )	18
2.2 Objetivos	18
2.2.1 General	18
2.2.2 Específicos	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1 Muestras	19
3.1.1 Animales	19
3.1.2 Material biológico	19
3.2 Evaluación computarizada de la movilidad espermática	20
3.2.1 Equipos y procedimiento	20
3.3 Ensayo de sustancias relativas al ácido tiobarbitúrico-(TBARS)	22
3.3.1 Procedimiento	22
3.4 Ensayo cometa	24
3.4.1 Procedimiento	24

3.5 Cuantificación Relativa de la Expresión Génica por PCR en tiempo real (RT-qPCR)	26
3.5.1 <i>Primers</i>	26
3.5.2 Procedimiento	26
3.5.2.1 Extracción de ARN y tratamiento con ADNasas	26
3.5.2.2 Cuantificación de ácidos nucleicos (ARN y ADNc)	28
3.5.2.3 Síntesis de ADNc	29
3.5.2.4 Estandarizaciones	29
3.5.2.4.1 Curva de eficiencia	29
3.5.2.4.2 Curva de disociación	29
3.5.2.5 Reacción de PCR	30
3.6 Análisis estadístico	30
4. RESULTADOS	30
4.1 Movilidad espermática	30
4.2 TBARS	33
4.3 Ensayo cometa bidimensional	34
4.4 Expresión génica	38
4.4.1 Extracción de ARN	38
4.4.2 Síntesis de ADNc	38
4.4.3 Curvas de eficiencia	39
4.4.4 Cuantificación de la expresión génica	40
5 DISCUSIÓN	43
6 CONCLUSIONES	49
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Rangos de edad en ratones C57BL en comparación con humanos. Tomado de Flurkey *et al.* (2007). 7
- Figura 2.** Ensayo cometa neutro y alcalino. Modificado de Shaman & Ward (2006). 9
- Figura 3.** Ensayo de SCSA. Modificado de Shaman & Ward (2006). 9
- Figura 4.** Hipótesis de daño sobre el ADN de la línea germinal masculina. Modificado de Aitken *et al.* (2009). 11
- Figura 5.** Aparición secuencial de las histonas, TPs y PRMs. Modificado de Zhao *et al.* 2004b. 13
- Figura 6.** Remodelamiento de la cromatina durante el intercambio desde histonas a protaminas. Modificado de Carrell *et al.* (2007). 16
- Figura 7.** Tipos de velocidades espermáticas evaluadas por CASA. Modificado de Goovaerts *et al.* (2006). 21
- Figura 8.** Flujograma del procedimiento de TBARS. 23
- Figura 9.** Flujograma del procedimiento del ensayo cometa. 25
- Figura 10.** Flujograma del procedimiento de extracción de ARN. 28
- Figura 11.** Velocidades de movimiento espermático medido con CASA. Eje X; velocidades de movimiento espermático: MOT: total, MP: progresiva, MR:

rápida, MM: media, ML: lenta, ME: estática. Barras representan media  $\pm$  EE.  
\* indica significancia estadística ( $p < 0.05$ ). 31

**Figura 12.** Tipos de desplazamiento de los espermatozoides medidos con CASA. Eje X; tipos de desplazamiento: VAP: velocidad promedio ( $\mu\text{m/s}$ ), VSL: velocidad en línea recta ( $\mu\text{m/s}$ ), VCL: velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), ALH: amplitud de desplazamiento lateral ( $\mu\text{m/s}$ ), BCF: frecuencia de batido (Hz), STR: rectitud en el desplazamiento, LIN: linearidad. Barras representan media  $\pm$  EE. \* indica significancia estadística ( $p < 0.05$ ). 33

**Figura 13.** Cuantificación de MDA mediante el ensayo TBARS. Barras representan media  $\pm$  EE. spz = espermatozoides. 33

**Figura 14.** Tipos de fragmentación del ADN espermático evaluados. Se visualiza espermatozoide a) sin fragmentación, b) fragmentación de una sola hebra, c) fragmentación de doble hebra y d) ambos tipos de fragmentación (hebra única y doble) simultáneamente. Se usó el fluoróforo Sybr Green. Aumento 400X . 34

**Figura 15.** Proporción de espermatozoides con ADN fragmentado y cantidad de ADN en la cola del cometa. Barras representan media  $\pm$  EE. spz = espermatozoides. 34

**Figura 16.** Distribución de los tipos de daño en el ADN espermático mediante el ensayo cometa bidimensional. 1H = fragmentación de una sola hebra, 2H = fragmentación de doble hebra y 2T = ambos tipos de fragmentación. Barras representan media  $\pm$  EE. 35

**Figura 17.** Distribución del % de ADN fragmentado en los espermatozoides del G1. 36

**Figura 18.** Distribución del % de ADN fragmentado en los espermatozoides del G2.

37

**Figura 19.** Comparación del % de ADN fragmentado en los espermatozoides del G1 y G2.

38

**Figura 20.** Cuantificación de ácidos nucleicos con el sistema Nanodrop. Se muestran las lecturas de absorbancias a 230, 260 y 280 nm y la cantidad de ng/uL de ADNc. Se usó este sistema para medir ARN y ADNc.

39

**Figura 21.** Curvas de eficiencia para la amplificación de *Tnp2*. Se observa la amplificación de 5 muestras de ADNc de testículo de ratón a 5 concentraciones distintas (10-fold).

40

**Figura 22.** Expresión relativa de los genes *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2* usando *Gadph* como *housekeeping*. Expresión del G2 en relación al G1. \* indica significancia estadística ( $p < 0.05$ ). Eje X: genes de estudio. Eje Y: valores de la cuantificación de la expresión relativa de los genes de estudio.

41

**Figura 23.** Expresión relativa de los genes *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2* usando *Actb* como gen *housekeeping*. Expresión del G2 en relación al G1. \* indica significancia estadística ( $p < 0.05$ ). Eje X: genes de estudio. Eje Y: valores de la cuantificación de la expresión relativa de los genes de estudio.

43



## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Secuencias de los *primers*.

26

**Tabla 2.** Velocidades de movimiento de los espermatozoides medidos por CASA entre ambos grupos de estudio. MOT: total, MP: progresiva, MR: rápida, MM: media, ML: lenta, ME: estática. Medias (%)  $\pm$  EE. \* indica significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

31

**Tabla 3.** Tipos de desplazamiento de los espermatozoides medidos por CASA entre ambos grupos de estudio. VAP: velocidad promedio ( $\mu\text{m/s}$ ), VSL: velocidad en línea recta ( $\mu\text{m/s}$ ), VCL: velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), ALH: amplitud de desplazamiento lateral ( $\mu\text{m/s}$ ), BCF: frecuencia de batido (Hz), STR: rectitud en el desplazamiento, LIN: linearidad. Medias (%)  $\pm$  EE. \* indica significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

32

**Tabla 4.** Tipo de fragmentación del ADN espermático mediante el ensayo cometa bidimensional. 1H = fragmentación de una sola hebra, 2H = fragmentación de doble hebra, 2T = ambos tipos de fragmentación. Medias (%)  $\pm$  EE.

35

**Tabla 5.** Distribución del grado de fragmentación espermática dentro del G1. Se analizaron 250 espermatozoides.

36

**Tabla 6.** Distribución del grado de fragmentación espermática dentro del G2. Se analizaron 250 espermatozoides.

37

### ABREVIACIONES

*Actb* = Gen actina beta

ADN = Ácido desoxirribonucleico.

ADNc = ADN complementario.

ALH = Amplitud de desplazamiento lateral ( $\mu\text{m/s}$ )

ARN = Ácido ribonucleico.

ARNm = ARN mensajero

ASRM = Sociedad Americana de Medicina Reproductiva

BCF = Frecuencia de batido (Hz)

CASA = Computer Assisted Sperm Analysis.

$\Delta C_T$  = Cycle Treshold.

DFI = Índice de fragmentación del ADN.

*dsDNA* = ADN de doble hebra.

dUTPs = deoxyuridine triphosphate

EE = Error estándar

*Gadph* = Gen gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa.

LIN = Linearidad

MDA = Malondialdehído.

ME = Movilidad estática

ML = Movilidad Lenta

MM = Movilidad media

MOT = Movilidad Total

MR = Movilidad rápida

PCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PRMs = Protaminas.

P1 = Protamina 1.

P2 = Protamina 2

*Prm1* = Gen protamina 1.

*Prm2* = Gen protamina 2.

RNP = Ribonucleoproteínas

ROS = Especies Reactivas de Oxígeno

RT-qPCR= PCR en tiempo real.

SCSA = Sperm chromatin structure sssay.

*SNPs* = Single Nucleotide Polymorphism

*ssDNA* = ADN de hebra única.

STR = Rectitud en el desplazamiento (proporción de VSL/VAP).

TBARS= Ensayo de sustancias relativas al ácido tiobarbitúrico.

TdT = Terminal deoxynucleotidyl transferase

*Tnp1* = Gen proteína de transición nuclear 1.

*Tnp2* = Gen proteína de transición nuclear 2.

TPs = Proteínas de transición nuclear.

TP1 = Proteína de transición nuclear 1.

TP2 = Proteína de transición nuclear 2.

TUNEL = Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.

VAP = Velocidad promedio ( $\mu\text{m/s}$ ).

VCL = Velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ).

VSL = Velocidad en línea recta ( $\mu\text{m/s}$ ).

## RESUMEN

La edad influye en el empaquetamiento adecuado de la cromatina espermática haciéndola más vulnerable con el transcurrir del tiempo. Las protaminas son las proteínas nucleares más abundantes en el espermatozoide maduro y empaquetan fuertemente el genoma paterno dentro del núcleo espermático, haciéndolo inaccesible a nucleasas o mutágenos, protegiendo de esta manera al ADN espermático. Ratones con sólo una copia de estos genes son infértiles, lo que demuestra que son esenciales para la función espermática normal. El objetivo de esta tesis fue investigar si existe relación entre la edad masculina y la protaminación espermática a nivel fisiológico y molecular. Se usaron ratones (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) macho de la cepa C57BLACK6 (C57BL6) (20 – 25 g), divididos en dos grupos etarios: ratones de 3-4 meses (Grupo joven: G1) y 18-21 meses (Grupo viejo: G2). Se emplearon espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo para los análisis de movilidad espermática, fragmentación del ADN mediante el ensayo cometa bidimensional y estrés oxidativo mediante TBARS. Se utilizó tejido testicular para evaluar la expresión génica de *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2*, mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR). Respecto a las velocidades de movimiento espermático se observó que el G1 presentó mayores valores que G2, en cuanto a MOT ( $50.63 \pm 6.60$  % vs  $30.38 \pm 5.16$  %,  $p < 0.05$ ) y MR ( $24.50 \pm 3.04$  % vs  $13.92 \pm 3.02$  %,  $p < 0.05$ ), mientras que ME fue mayor en G2 que en G1 ( $69.31 \pm 5.31$  % vs  $48.38 \pm 7.39$  %,  $p < 0.05$ ). Respecto a los tipos de desplazamiento de los espermatozoides, se observó que G1 presentó mayores valores que G2 respecto a VAP ( $67.89 \pm 5.68$  % vs  $52.12 \pm 3.38$  %,  $p < 0.05$ ) y VSL ( $43.15 \pm 3.47$  % vs  $30.68 \pm 2.45$  %,  $p < 0.05$ ). El estrés oxidativo medido con TBARS no presentó diferencias entre el G1 y G2 ( $132.50 \pm 9.64$  ng MDA/ $10^6$ spz vs  $135.00 \pm 10.81$  ng MDA/ $10^6$ spz;  $p > 0.05$ ). Tampoco se observaron diferencias significativas en la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado

entre los grupos G1 y G2 ( $20.51 \pm 1.41$  % vs  $20.11 \pm 1.29$  %,  $p>0.05$ ), ni en la cantidad de ADN fragmentado por espermatozoide entre ambos grupos ( $17.36 \pm 0.49$  % vs  $17.76 \pm 0.62$  %,  $p>0.05$ ). La comparación de los niveles de expresión de los genes *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2* demostró que *Prm2* y *Tnp1* en el G2 se sobreexpresan observándose una diferencia significativa respecto al G1 ( $p<0.05$ ), sin embargo, *Prm1* y *Tnp2* no mostraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Si bien el aumento de la edad presentó diferencias significativas con los niveles de expresión *Prm2* y *Tnp1*, esto no sería suficiente para ejercer algún impacto sobre la producción de ROS y el aumento de la fragmentación del ADN espermático, debido quizás al papel protagónico de *Prm1* en la protaminación espermática reportado en todas las especies estudiadas hasta la fecha y cuyos niveles de expresión no son alterados en el grupo de ratones viejos. Se concluye que el incremento de la edad no altera la protaminación espermática en ratones.

## ABSTRACT

Age has an influence in the proper packaging of sperm chromatin, rendering it more vulnerable as time goes on. Protamines are the most abundant nuclear proteins in the mature spermatozoon and they are responsible for packing the paternal genome inside the sperm cell nucleus, making it inaccessible to nucleases or mutagens, thus protecting it. Mice with only one copy of these genes are infertile, which proves that are essential for normal spermatic function. The aim of this study was to look for a correlation between male age and sperm protamination at molecular and physiological levels. Male mice (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) from C57BLACK6 (C57BL6) strain (20-25g) were used and distributed in two age groups: 3-4 month old mice ("Young" group: G1) and 18-21 month old ("Elderly" group: G2). Spermatozoa obtained from the epididymis tail were employed in sperm motility analysis, DNA fragmentation analysis by bidimensional comet assay, and oxidative stress by TBARS assay. Testicular tissue was used for assess the gene expression of *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* and *Tnp2*, by real time PCR (RT-qPCR). When analyzing sperm motility, MOT ( $50.63 \pm 6.60\%$  vs  $30.38 \pm 5.16\%$ ) and MR ( $24.50 \pm 3.04\%$  vs  $13.92 \pm 3.02\%$ ) were higher in G1 compared to G2 ( $p < 0.05$ ). However, ME was higher in G2 compared to G1 ( $69.31 \pm 5.31\%$  vs  $48.38 \pm 7.39\%$ , respectively) ( $p < 0.05$ ). Likewise, when analyzing displacement types in the sperm cells, VAP ( $67.89 \pm 5.68\%$  vs  $52.12 \pm 3.38\%$ ,  $p < 0.05$ ) and VSL ( $43.15 \pm 3.47\%$  vs  $30.68 \pm 2.45\%$ ,  $p < 0.05$ ) were higher in G1 compared to G2. Oxidative stress levels measured by TBARS did not show any differences between G1 and G2 ( $132.50 \pm 9.64$  ng MDA/ $10^6$ spz vs  $135.00 \pm 10.81$  ng MDA/ $10^6$ spz;  $p > 0.05$ ). The proportion of sperm cells with fragmented DNA were not significantly different (G1 vs G2,  $20.51 \pm 1.41\%$  vs  $20.11 \pm 1.29\%$  respectively,  $p > 0.05$ ) and there were also no differences in the percentage of fragmented DNA of those subpopulations ( $17.36 \pm 0.49\%$  vs  $17.76 \pm 0.62\%$ ,  $p > 0.05$ ). Gene expression levels of *Prm2* and *Tnp1* were significantly overexpressed in G2 in comparison to G1 ( $p < 0.05$ ); however, *Prm1* and *Tnp2* did not show significant differences between both groups ( $p < 0.05$ ). Despite of

age had an influence in expression levels of *Prm2* and *Tnp1*, it would not be relevant enough to alter ROS production and sperm DNA fragmentation. It was probably due to the central role of *Prm1* in sperm protamination, something widely reported in all studied species to date, which levels were not altered in the elderly group. As a conclusion, increase of age does not alter sperm protamination in mice.



## INTRODUCCIÓN

La espermatogénesis es un proceso complejo y coordinado, que consiste de tres fases distintas (Sharpe 1994). Primero, en la fase proliferativa, las espermatogonias experimentan una serie de divisiones mitóticas y se diferencian en espermátocitos primarios (Clermont 1962) que entran a la segunda fase, o fase meiótica, en la cual ocurre la meiosis y recombinación genética, produciendo la formación de espermátides haploides (Stern 1993). La tercera fase llamada espermiogénesis, implica el rearrreglo de la estructura del citoesqueleto, transformando células germinales redondas en células especializadas, los espermatozoides (Clermont *et al.* 1993). Durante este proceso actúan proteínas nucleares, primero las histonas compactan el ADN formando nucleosomas y, las protaminas se unen al ADN espermático permitiendo el enrollamiento y condensación del ADN en subunidades mucho más grandes conocidas como toroides (Aoki & Carrell 2003). La cromatina espermática experimenta una fuerte compactación, llegando a compactarse 6 veces más que una célula somática (Shaman & Ward 2006). El primer evento en esta transformación ocurre en estadio de espermátides redondas, donde las histonas somáticas son hiperacetiladas y reemplazadas por las proteínas de transición nuclear (TP1 y TP2); luego en el estadio de espermátide elongada, éstas son reemplazadas por otras proteínas, conocidas como protaminas (P1 y P2) (Carrell *et al.* 2007). Este remodelamiento de la cromatina es acompañado de cambios en la forma del núcleo espermático, desenrollamiento del ADN, inducción de quiebras transitorias en el ADN y condensación de la cromatina (Carrell *et al.* 2007). Ratones con sólo una copia de estos genes demostraron, en estudios individuales, su importancia en la fisiología espermática (Cho *et al.* 2001; Yu *et al.* 2000; Zhao *et al.* 2001). Se han descrito cambios estructurales en los túbulos seminíferos de rata (*Rattus norvegicus*) (Levy *et al.* 1999) y hámster (*Mesocricetus auratus*) (Morales *et al.* 2004) y la alteración de la expresión génica en células madre espermatogoniales murinas en relación al aumento de la edad (Kokkinaki *et al.* 2010). En consideración de la gran cantidad de divisiones celulares que experimentan las células de la línea espermática masculina durante toda su vida, podría sugerir que el acumulado

de mutaciones en el ADN de la línea germinal disminuye la salud reproductiva del individuo. Existen escasos trabajos sobre la influencia de la edad avanzada sobre los parámetros reproductivos masculinos en los murinos (Zubkova & Robaire 2006). Actualmente, es totalmente desconocido si la protaminación espermática es influenciada por la edad. Tanto la edad como la protaminación espermática son características de enorme influencia sobre la fertilidad masculina (Carrell *et al.* 2007; Aitken *et al.* 2009). En el desarrollo de este trabajo de investigación se deseó demostrar si existía relación entre el aumento de la edad y la protaminación espermática y, los resultados obtenidos podrían ser tomados en cuenta para entender si existe una relación semejante en humanos.

## **1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1 Edad y fertilidad masculina**

La eficiencia de distintas funciones fisiológicas en humanos disminuye con el transcurrir de los años pudiendo alterar la producción adecuada de óvulos y espermatozoides (Plas *et al.* 2000; Kidd *et al.* 2001). Aunque generalmente se ha aceptado que la fertilidad masculina no es tan influenciada por la edad debido a la producción continua de células germinales, este tema aún se mantiene controversial. Existe un consenso respecto al aumento de la edad masculina y la disminución de la calidad seminal; el volumen, movilidad y morfología espermática normal disminuyen y la concentración no es afectada (Eskenazi *et al.* 2003; Levitas *et al.* 2007; Whitcomb *et al.* 2011). La producción diaria espermática se reduce en hombres mayores de 50 años (Johnson *et al.* 1984, 1990) y en ratas de 22 meses (Wang *et al.* 1993), las células de Sertoli disminuyen acumulando gotas lipídicas citoplasmáticas (Harbitz 1973; Tsitouras 1987; Holstein 1989), las células de Leydig también disminuyen (Tsitouras 1987) y experimentan multinucleación (Paniagua *et al.* 1986). A su vez, se incrementan las espermatogonias multinucleadas, megaloespermatocitos y espermátides gigantes (Holstein 1989). En ratones se ha demostrado que individuos viejos (18 meses) comparados a individuos jóvenes, presentan mayor cantidad de vacuolas en las células germinales y el epitelio seminífero más grueso (Tanemura *et al.* 1993), mayor incidencia de mutaciones y aneuploidías en la descendencia (Lowe *et al.* 1995; Serre & Robaire 1998a; Walter *et al.* 1998) y alteración en los niveles de expresión génica en las células madre espermatogoniales (Kokkinaki *et al.* 2010). También se han observado cambios estructurales en los túbulos seminíferos de ratas (Levy *et al.* 1999) y hámsters (Morales *et al.* 2004). Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente y la gran cantidad de divisiones celulares que experimentan las células de la línea germinal masculina, es lógico hipotetizar que se podrían estar acumulando mutaciones en el ADN (Hurst & Ellegren 1998; Crow 1999).

La edad ejerce diferentes efectos en el aparato reproductivo masculino; en ratas la espermatogénesis y la esteroidogénesis disminuyen (Levy *et al.*

1999, Zirkin & Chen 2000), se acumulan gránulos de lipofucsina en el epitelio del epidídimo y aumenta el grosor de la membrana basal (Serre & Robaire 1998b). En el epidídimo se han observado alteraciones en la expresión de genes relacionados a estrés oxidativo (Jervis & Robaire 2002), estos cambios comprenden la disminución de algunos ARNm, como 5 alfa-reductasa y proencefalina (Viger & Robaire 1995). Las glándulas sexuales accesorias también experimentan cambios; la actividad secretoria de la próstata central disminuye y en las células prostáticas se pueden observar lisosomas pleomórficos supra y para nucleares (Zirkin & Strandberg 1984). En ratones, a pesar de la evidente asociación de la edad y la infertilidad del macho, aún no se han evaluado los cambios que ocurren con la fisiología espermática, ni mucho menos, aspectos a nivel molecular sobre esta interacción.

En humanos, generalmente se reconoce que a los 40 años la fertilidad masculina empieza a ser afectada (Hassan & Killick 2003; Sartorius & Nieschlag 2010), y las parejas fértiles tienen menos probabilidades de lograr un embarazo cuando la edad paterna y materna está por encima de los 40 y 35 años, respectivamente (De La Rochebrochard & Thonneau 2002, 2003). La Sociedad Europea de Embriología y Reproducción Humana (ESHRE) (Baird *et al.* 2005) concluyó que la edad materna se relaciona con la infertilidad porque el número y calidad de ovocitos disminuye, siendo clínicamente relevante a los 35 años. Sin embargo, respecto a la edad masculina e infertilidad expresaron que esta relación aún es demasiado contradictoria. A su vez, la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) (Plas *et al.* 2000) recomienda que 50 años sea la edad máxima para donadores de semen. El 15% de parejas en edad reproductiva son infértiles, de ellas el 25% (Templeton 1995) a 40% (Fleming *et al.* 1995) debido al factor masculino, por lo cual es de suma importancia identificar qué repercusiones tendría la edad masculina sobre la fisiología espermática.

La edad paterna se ha relacionado con un amplio rango de aspectos reproductivos y genéticos (Baird *et al.* 2005; Lambert *et al.* 2006; Sartorius & Nieschlag 2010), en cohortes de hombres normospermicos (Wyrobek *et al.*

2006; Schmid *et al.* 2007) y hombres infértiles (Moskovtsev *et al.* 2007; Vagnini *et al.* 2007). Se han observado alteraciones en los niveles de metilación del ADN de la descendencia de hombres de edad avanzada (Adkins *et al.* 2011), aumento en la frecuencia de abortos espontáneos (Nybo Andersen *et al.* 2004; Slama *et al.* 2005; Kleinhaus *et al.* 2006), desarrollo de mutaciones génicas y enfermedades de etiología compleja (Crow 1999; Zhang *et al.* 1999). Además, se ha observado relación positiva entre la edad y la presencia de anormalidades cromosómicas numéricas y estructurales en espermatozoides murinos y humanos (Shi & Martin 2000; Sartorelli *et al.* 2001; Bosch *et al.* 2003; Slotter *et al.* 2004).

### **Cómo se define las fases de la vida en ratones en comparación con los humanos?**

Los ratones tienen diferentes tiempos de vida media. La mayoría de estudios se enfocan en dos o tres fases específicas de la vida: adulto maduro, edad media y viejos.

La figura 1, en base a un cálculo de 150 hembras y 150 machos, se muestra las equivalencias de vida entre ratones y humanos. Ratones de 3 a 6 meses de edad (adulto maduro) se corresponden con humanos de 20 a 30 años, ratones de 10 a 14 meses de edad (edad media) se corresponden con humanos de 38 a 47, ratones de 18 a 24 meses de edad (viejos) se corresponden con humanos de 59 a 69 años (Flurkey *et al.* 2007).

- **Adulto maduro: 3- 6 meses de edad**

Este grupo consiste de ratones que han culminado su desarrollo pero aún no han sido afectados por la senescencia. Los ratones de este grupo deben tener al menos 3 meses de edad, aunque son sexualmente maduros a los 35

días, se requiere de un posterior periodo de maduración continua para la mayoría de procesos biológicos y estructuras hasta aproximadamente los 3 meses. El límite de edad para ratones dentro de este grupo es de 6 meses.

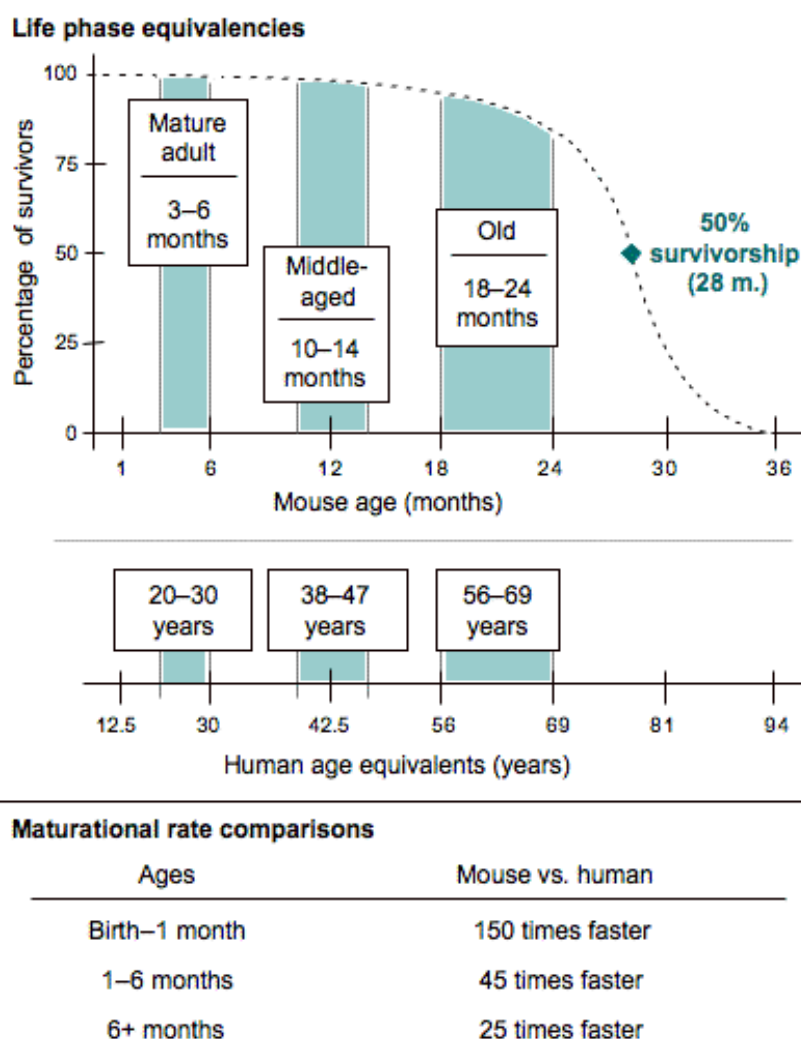
- **Edad media:** 10-15 meses de edad

Esta edad se refiere a una fase durante la cual pueden ser detectados algunos cambios propios de la senescencia. Un grupo de estos ratones a menudo es incluido en estudios de envejecimiento para determinar si un cambio relacionado con la edad es progresivo o es primero expresado sólo en viejos. Los ratones deben tener al menos 10 meses de edad y como máximo entre 14 y 15 meses de edad.

- **Viejos:** 18-24 meses de edad

Este grupo comprende ratones en los cuales se puede detectar cambios propios de la senescencia en casi todos los biomarcadores del animal. Para ser incluidos en este grupo los ratones deberían tener al menos 18 meses de edad.

El 50% de ratones vive hasta los 28 meses con un máximo de 36 meses, variando entre cepas (Flurkey *et al.* 2007). El tiempo de vida media de la cepa C57BL es de  $815 \pm 16$  días (Leiter *et al.* 1988), valor muy cercano al promedio de 28 meses.



**Figura 1.** Rangos de edad en ratones C57BL en comparación con humanos. Tomado de Flurkey *et al.* (2007).

## 1.2 Fragmentación del ADN espermático

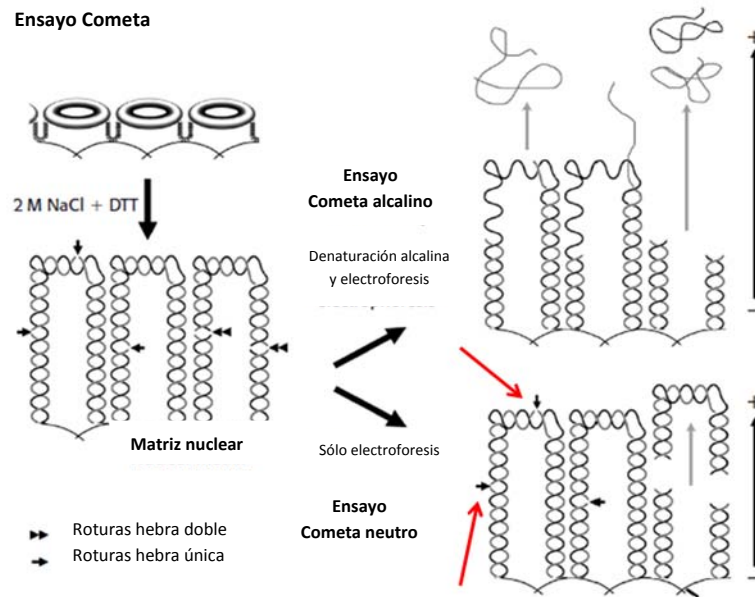
La evaluación de la fragmentación del ADN espermático surge como alternativa para explicar las causas que podrían estar relacionadas al factor de infertilidad de origen desconocido. La fragmentación del ADN espermático se ha relacionado con muchos aspectos reproductivos (Virro *et al.* 2004; Nasr-Esfahani *et al.* 2005; Borini *et al.* 2006; Erenpreiss *et al.* 2006; Tesarik *et al.* 2006; Zini & Libman 2006; Bungum *et al.* 2007; Fernandez-Gonzalez *et al.* 2008; Aitken *et al.* 2009; Smith *et al.* 2009; Adiga *et al.* 2010), encontrándose correlación positiva con la edad masculina (Morris *et al.* 2002; Singh *et al.*

2003; Moskovtsev *et al.* 2007; Schmid *et al.* 2007; Vagnini *et al.* 2007; Hammiche *et al.* 2011). El daño al ADN espermático es predictivo de las tasas de fertilización y embarazo (Morris *et al.* 2002; Henkel *et al.* 2003, 2004; Lewis *et al.* 2003). Son estas relaciones comprobadas las que demuestran la importancia de la fragmentación del ADN espermático.

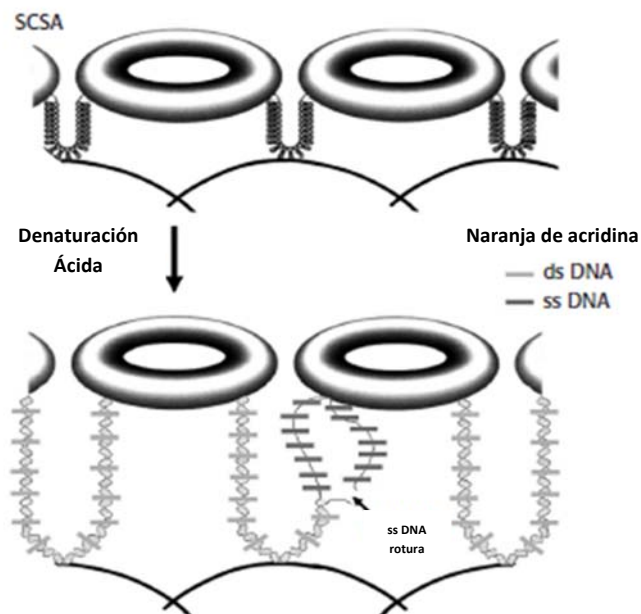
La fragmentación del ADN es evaluada mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Las técnicas más importantes son: la electroforesis de una célula individual o “ensayo cometa” (Singh *et al.* 1989), el ensayo de estructura de la cromatina espermática (SCSA) (Evenson *et al.* 1980) y el ensayo TUNEL (Gorczyca *et al.* 1993 a, b). El “ensayo cometa” evalúa la capacidad de la cromatina a soportar condiciones variantes de pH, en condiciones neutras detecta roturas en las dos hebras del ADN y en alcalinas detecta roturas en una hebra del ADN (Figura 1). El ensayo TUNEL evalúa la presencia de extremos 3'-hidróxilo libres, los cuales son identificados por la enzima TdT que cataliza la adición de dUTPs marcados con fluorescencia en las roturas de las hebras del ADN. El ensayo SCSA mide la susceptibilidad del ADN espermático a la denaturación ácida, la cual depende de los sitios lábiles o roturas presentes en el ADN (Evenson & Wixon 2006) (Figura 2), este daño es cuantificado por el índice de fragmentación del ADN (DFI) asociado positivamente a características reproductivas importantes en humanos (Spano *et al.* 2000), ratones (Evenson *et al.* 1980) y toros (Ballachey *et al.* 1987, 1988).



### Ensayo Cometa



**Figura 2.** Ensayo cometa neutro y alcalino. Modificado de Shaman & Ward (2006).



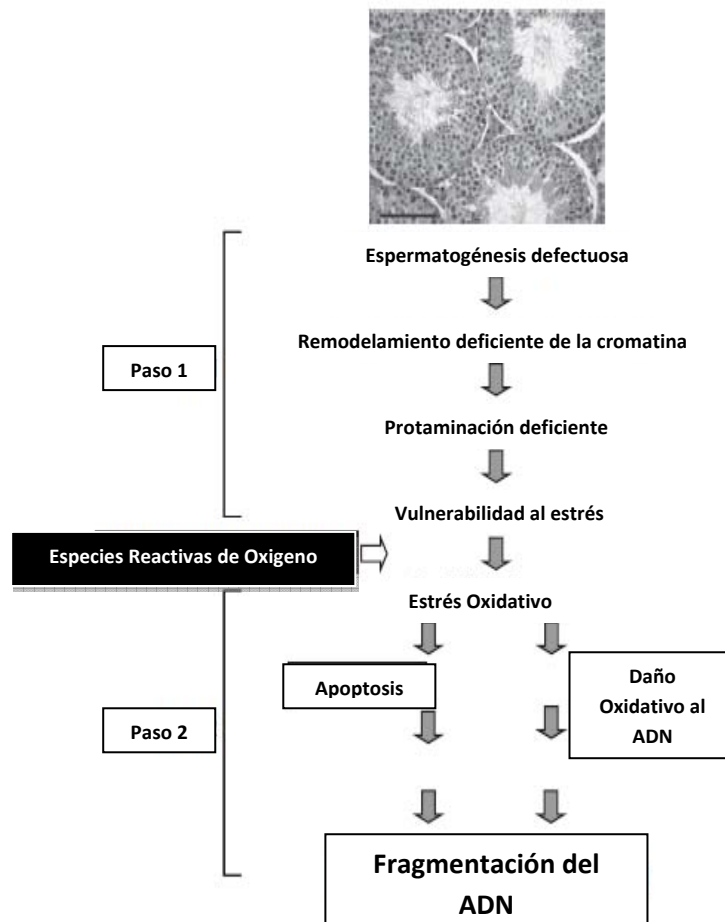
**Figura 3.** Ensayo SCSA. Modificado de Shaman & Ward (2006).

### 1.3 Estrés Oxidativo

La composición lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide mamífero es diferente al de una célula somática. Los espermatozoides tienen altos niveles de fosfolípidos, esteroides, ácidos grasos saturados y poliinsaturados, convirtiéndolos en células particularmente susceptibles a daño por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Aitken & Clarkson 1987; Alvarez *et al.* 1987; Alvarez & Storey 1995). La generación de ROS a niveles patológicos puede ser originada por varios mecanismos como: radiación ionizante (Zhang *et al.* 1999), células inflamatorias (Villegas *et al.* 2003), activación de oxidasas y oxigenasas (Davydov 2001) y pérdida de capacidad antioxidante (Aitken & Sawyer 2003). Un organismo de edad avanzada está expuesto a un alto estrés oxidativo, debido a la disminución en la función de la cadena respiratoria mitocondrial (Wei & Lee 2001), produciendo acumulación de daño por radicales libres al ADN, ARN y proteínas (Holmes *et al.* 1992) y alteraciones en los niveles de enzimas antioxidantes (Sanz *et al.* 1997).

El estrés oxidativo generado por ROS conlleva a infertilidad por dos mecanismos: daño a la membrana espermática, lo que disminuye la movilidad del espermatozoide y su capacidad para fusionarse con el ovocito, y el daño al ADN espermático, alterando la contribución genómica paterna hacia el embrión. Por lo tanto, espermatozoides íntegros funcionalmente son esenciales para la fertilización *in vivo* e *in vitro*. En ratas se ha demostrado alteraciones en la integridad y el empaquetamiento normal del ADN espermático en machos viejos, haciéndolo más susceptible al daño oxidativo (Zubkova *et al.* 2005, Zubkova & Robaire 2006).

La arquitectura física del espermatozoide previene cualquier actividad nucleasa como resultado del proceso apoptótico cuando alguna enzima con capacidad ADNasa accede al ADN nuclear e induce fragmentación, es por esta razón que la mayor parte de la fragmentación del ADN espermático es producto del daño oxidativo antes que algún evento apoptótico, de aquí se deriva la importancia de su análisis.



**Figura 4.** Hipótesis de daño sobre el ADN de la línea germinal masculina. Modificado de Aitken *et al.* (2009).

## 1.4 Proteínas nucleares espermáticas

### 1.4.1 Protaminas

Las protaminas son las proteínas nucleares más abundantes en el espermatozoide maduro y empaquetan el genoma paterno dentro del núcleo espermático (Aoki & Carrell 2003; Lewis *et al.* 2003). Las protaminas, P1 y P2, son codificadas por los genes *Prm1* y *Prm2* respectivamente. P1 se expresa en todos los mamíferos (Carrell *et al.* 2007) mientras que P2 se expresa en el ratón (Balhorn *et al.* 1984), rata (Bower *et al.* 1987), humano (Tanphaichitr *et al.* 1978; Balhorn *et al.* 1987) y algunas especies de hámster (Corzett *et al.* 1999). Ambas proteínas aparecen en una proporción P1/P2 que varía dentro de los mamíferos euterianos (Corzett *et al.* 2002), siendo igual a 1 en humanos

(aprox. 0.8–1.2) (Balhorn *et al.* 1988) y en ratones la cantidad de P2 duplica la de P1 (2:1) (Corzett *et al.* 2002; Shirley *et al.* 2004).

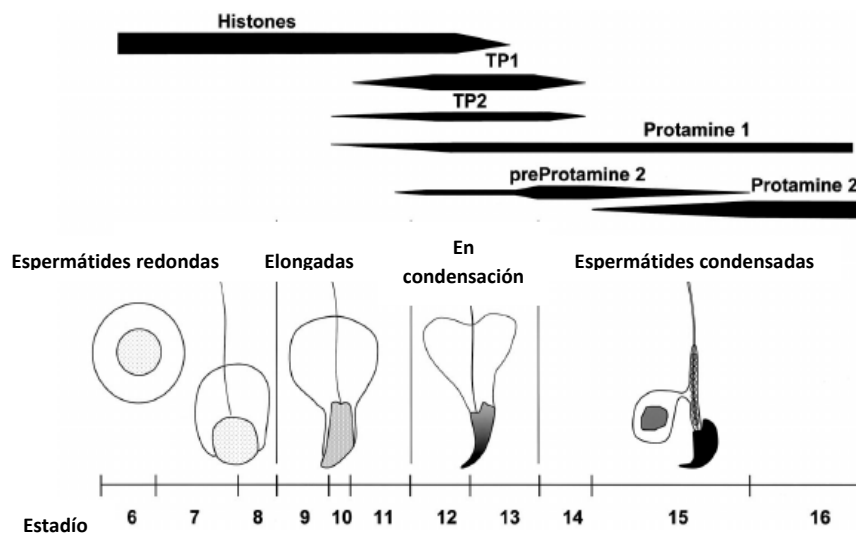
Durante la espermiogénesis ocurre el intercambio de histonas por TPs, y posteriormente por PRMs. Las PRMs reemplazan las histonas presentes inicialmente en las espermátides redondas, 80% en humanos (Tanphaichitr *et al.* 1978) y 98% en ratones (Bench *et al.* 1996). Son proteínas fuertemente básicas ricas en arginina (hasta 70%) y residuos de cisteína, la gran cantidad de arginina provee una fuerte carga positiva facilitando su unión al ADN y garantizando el reemplazo de las histonas y las TPs; los múltiples residuos de cisteína son oxidados para formar puentes disulfuros (S-S) entre las protaminas y estabilizar la cromatina durante los estadios finales de la maduración espermática (Balhorn 2007). P1 exhibe 50% de similaridad entre las protaminas mamíferas (Balhorn 2007) y está demostrado en humanos (Aoki & Carrell 2003) y ratones (Yelick *et al.* 1987) que es traducida como una proteína madura, mientras que P2 es traducida como una proteína precursora que se une al ADN y luego experimenta procesamiento proteolítico. La espermiogénesis en ratones puede ser clasificada en tres fases que consisten de 16 estadios de espermátides (Russell *et al.* 1990): espermátides redondas (estadios 1-8) (Figura 5), espermátides en elongación (estadios 9-12) y espermátides elongadas (13-16). En ratones, los ARNm de *Prm1* y *Prm2* se detectan en espermátides estadio 7 y se degradan en el estadio 14 y 15 respectivamente (Mali *et al.* 1989); mientras que P1 y P2 aparecen recién en el estadio 12 y 14 respectivamente (Balhorn *et al.* 1984).

Las protaminas condensan fuertemente el núcleo espermático, así, los espermatozoides adquieren una forma más hidrodinámica, mayor velocidad y probabilidad de fecundar (Oliva & Dixon 1991), a su vez es menos accesible a nucleasas o mutágenos. Cada molécula de P1 se une a 10-11 pb de ADN, mientras que P2 se une a 15 pb, esta unión neutraliza las cargas negativas a lo largo de la estructura fosfodiéster del ADN y permite la unión más fuerte de estas proteínas a las moléculas adyacentes de ADN. Ratones con sólo una copia de *Prm1* y *Prm2* son infértiles lo que demuestra que ambas son

esenciales en la función espermática normal (Cho *et al.* 2001), la deficiencia de P2 produce niveles elevados de apoptosis en las células espermáticas y detenimiento embrionario (Cho *et al.* 2003).

### 1.4.2 Proteínas de Transición Nuclear

Las TP1 y TP2 son codificadas por los genes *Tnp1* y *Tnp2*. Son proteínas básicas ricas en lisina y arginina (Brewer *et al.* 2002), que se expresan durante los estadios de espermátides haploides, condensadas y elongadas (Meistrich 1989) y reemplazan las histonas presentes en las espermátides redondas. En ratones, los ARNm de *Tnp1* y *Tnp2* se detectan en espermátides estadio 7 y son degradadas en el estadio 13 y 14 respectivamente (Mali *et al.* 1989; Shih & Kleene 1992). Las TP1 y TP2 aparecen simultáneamente en espermátides estadios 10-11 (Meistrich *et al.* 1994; Wu *et al.* 2000), alcanzando máximos niveles durante los estadios 12-13, en donde las TPs constituyen el 90% de las proteínas básicas de la cromatina, con niveles de TP1 alrededor de 2.5 veces los de TP2 (Yu *et al.* 2000) y disminuyen durante el estadio 14, desapareciendo completamente en el estadio 15 (Heidaran *et al.* 1988; Alfonso & Kistler 1993). Figura 5.



**Figura 5.** Aparición secuencial de las histonas, TPs y PRMs. Modificado de Zhao *et al.* (2004b).

Yu *et al.* (2000) describieron que los espermatozoides de ratones *knock out* para *Tnp1* condensan su cromatina de manera irregular disminuyendo su fertilidad, mientras que los espermatozoides de ratones *knock out* para *Tnp2*,

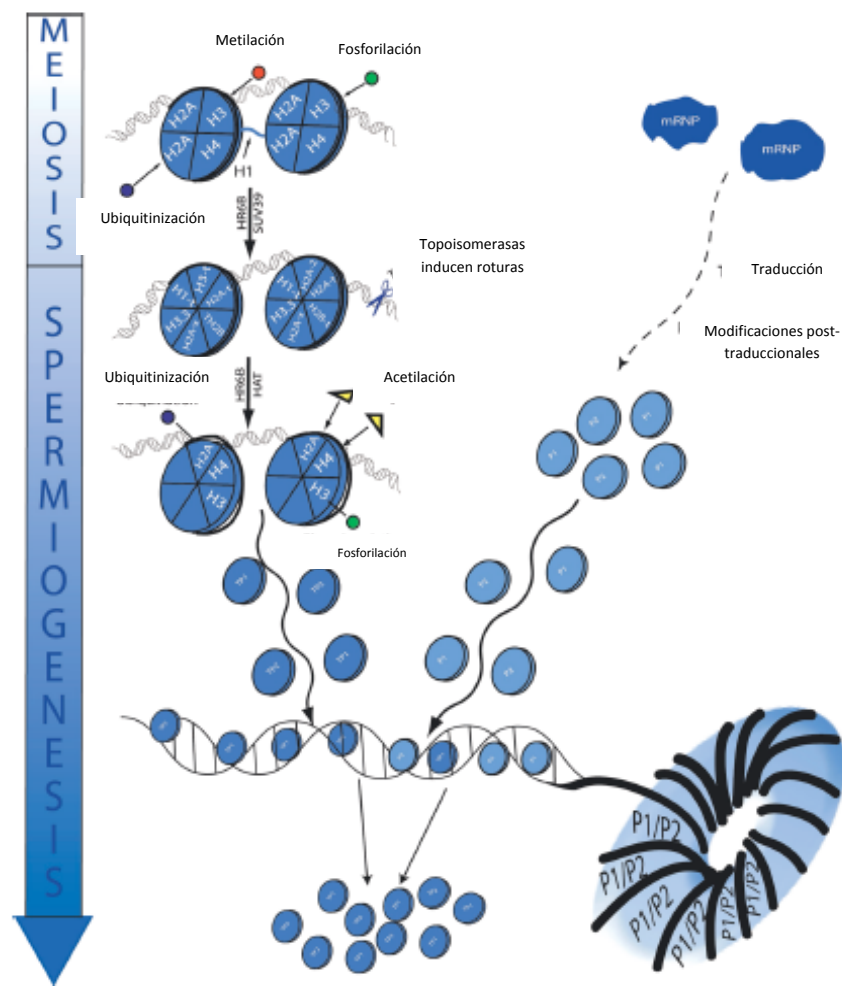
producen normalmente los primeros estadios de la condensación de la cromatina, sin embargo P2 no se procesa correctamente lo cual impide que se complete la condensación de la cromatina (Zhao *et al.* 2001). Se describió que la carencia de uno de estos genes era compensada por el otro, debido a que cuando uno era silenciado, el otro se expresaba en gran cantidad (Adham *et al.* 2001). Sin embargo, Zhao *et al.* (2004b) observaron que la ausencia de una TP afecta el desplazamiento de la otra, demostrándose que permanece en el núcleo en niveles elevados como consecuencia de una retención prolongada y no de la mayor síntesis de la misma. En ratones *knockt out* para ambos genes, *Tnp1* y *Tnp2*, se observó que las TPs son requeridas para la condensación normal de la cromatina, integridad del ADN, formación de espermatozoides normales y fertilidad (Zhao *et al.* 2004a). Existen SNPs en ambos genes que tienen relación con infertilidad (Miyagawa *et al.* 2005), mediante la disminución de las TPs y la fragmentación del ADN espermático (Meistrich *et al.* 2003; Shirley *et al.* 2004; Santiso *et al.* 2007).

Las funciones de las proteínas de transición se deducen fundamentalmente de estudios *in vitro*, se ha observado que TP1 desestabiliza los núcleos y previene la unión del ADN, lo cual facilita el desplazamiento de histonas (Baskaran & Rao 1991; Levesque *et al.* 1998). Además, está implicada en la reparación de roturas en el ADN (Boissonneault 2002; Caron *et al.* 2001). TP2, mediante los “dedos de zinc”, se une selectivamente a los sitios CpG lo que sugiere que es la responsable de la represión de la síntesis de ADN (Kundu & Rao 1996). Ambas pueden condensar el ADN, siendo más efectiva la TP2 (Brewer *et al.* 2002).

### 1.4.3 Compactación del ADN espermático

Mientras que las histonas compactan el ADN formando nucleosomas, las protaminas enrollan y condensan el ADN en subunidades mucho más

grandes conocidas como toroides (Balhorn *et al.* 1999). Durante la espermiogénesis, la cromatina espermática experimenta una fuerte compactación, 6 veces más que una célula somática (McLay & Clarke 2003). El primer evento en esta fascinante transformación ocurre en las espermátides redondas, donde las histonas somáticas son hiperacetiladas y reemplazadas por TP1 y TP2, posteriormente en espermátide elongada, las protaminas reemplazan las TPs y como resultado se obtiene una cromatina fuertemente condensada y transcripcionalmente silenciada (Wouters-Tyrou *et al.* 1998; Aoki & Carrell 2003), aunque esto último ha sido refutado y permanece en discusión (Spadafora 2008). Este remodelamiento en la cromatina, paralelamente está acompañado de cambios en la forma del núcleo espermático, el cambio de un ADN negativo nucleosomal superenrollado a un estado no superenrollado (Ward *et al.* 1989) y la inducción de quiebres transitorios en el ADN para la posterior condensación de la cromatina (McPherson & Longo 1993) (Figura 6). Curiosamente, en el proceso de fertilización, luego de la penetración del espermatozoide hacia el interior del ovocito, el núcleo espermático se descondensará de nuevo para formar el pronúcleo masculino, de esta manera las protaminas ahora serán intercambiadas por histonas maternas, permitiendo así que el material genético se transcriba y duplique iniciando la mitosis (Berrios & Bedford 1979; Yanagimachi 1994).



**Figura 6.** Remodelamiento de la cromatina durante el intercambio desde histonas a protaminas. Modificado de Carrell *et al.* (2007)

La regulación de la traducción es el evento más importante de la biología de las protaminas, es responsable que P1 y P2 no aparezcan hasta la fase de elongación de la espermiogénesis mediante el almacenamiento de los ARNm en ribonucleoproteínas mensajeras (mRNP) solubles en el citoplasma de la espermátide (Kleene 1996; Steger 2001; Steger *et al.* 2001) evitando la compactación precoz del ADN y el detenimiento del desarrollo del espermatozoide (Lee *et al.* 1995). Esta represión transcripcional se puede visualizar por el incremento de los mRNPs durante el estadio de espermátide redonda (Moussa *et al.* 1994), cada espermátide contiene 20 000 transcritos



de protamina (Braun *et al.* 1989) los cuales pueden ser almacenados como ARNm silenciado por hasta 7 días (Hecht 1998).

#### 1.4.4 Niveles de protaminación espermática

La disminución de protaminas se ha relacionado con problemas reproductivos (Nasr-Esfahani *et al.* 2004a, 2005) y la alteración de la proporción P1/P2 se ha asociado con mala calidad espermática (Carrell & Liu 2001; Aoki *et al.* 2005a, 2006a), fertilización (Nasr-Esfahani *et al.* 2004a, b, 2007; Aoki *et al.* 2006a), calidad embrionaria (Nasr-Esfahani *et al.* 2004b) y fragmentación del ADN espermático (Torregrosa *et al.* 2006; Castillo *et al.* 2011; García Peiró *et al.* 2011). Inicialmente se creía que la alteración de la proporción P1/P2 se debía a la disminución de sólo P2 (Carrell & Liu 2001, Nasr-Esfahani *et al.* 2004b), encontrando esta idea apoyo en la existencia de hombres infértiles que tenían valores indetectables de esta proteína (De Yebra *et al.* 1993). Sin embargo Aoki *et al.* (2005a) demostraron que ambas protaminas podrían ser alteradas debido a que valores fisiológicos espermáticos disminuían en pacientes con proporciones P1/P2 distintos a 1, siendo más notorio en proporciones menores a 1, donde P1 estaba disminuido.

A su vez, la proporción de la expresión de los genes *Prm1/Prm2* ha mostrado correlación con fertilidad (Steger *et al.* 2001), observándose que la alteración de tal proporción se debe a una fuerte disminución de la expresión del gen *Prm1* y no del gen *Prm2* (Steger *et al.* 2003). Aoki *et al.* (2006b) relacionan la cantidad de ARNm de *Prm1* y *Prm2* con sus respectivas proteínas, observando que *Prm1* se encuentra sobreexpresada en individuos con poca P1, en comparación a los pacientes con proteína P1 normales. Observaciones similares se realizaron en la mayoría de individuos con la expresión del gen *Prm2* elevada, sugiriendo que defectos en la regulación de la traducción de estas proteínas contribuye a la infertilidad. Sin embargo, Steger *et al.* (2008) analizaron la proporción *Prm1/Prm2* y no observaron relación con la fertilidad.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1 HIPÓTESIS:**

#### **2.1.1 Hipótesis Nula ( $H_0$ ):**

$H_0$ : La edad en ratones no tiene relación con la fisiología espermática y los niveles de expresión de los genes *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2*.

#### **2.1.2 Hipótesis Alternativa ( $H_1$ ):**

$H_1$ : La edad en ratones tiene relación con la fisiología espermática y los niveles de expresión de los genes *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2*.

### **2.2 OBJETIVOS:**

#### **2.2.1 General**

✓ Determinar si el incremento de la edad en ratones tiene implicancias sobre la fisiología espermática y los niveles de expresión de los genes *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2*.

#### **2.2.2 Específicos**

✓ Comparar los valores de movilidad espermática entre ratones jóvenes y viejos.

✓ Comparar la producción de TBARS entre espermatozoides de ratones jóvenes y viejos.

✓ Comparar los niveles de fragmentación del ADN espermático entre ratones jóvenes y viejos.

✓ Determinar si los niveles de expresión génica de *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2* son alterados en ratones viejos.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **Lugar de ejecución**

La presente tesis se realizó en los laboratorios de “Fertilización in Vitro, Clonaje y Transgenia Animal” y “Semen y Andrología” del Departamento de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia –Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo-Brasil.

### **3.1 Muestras**

#### **3.1.1 Animales**

Se usaron ratones machos C57BL6 (*Mus musculus*) (20 – 25gr.) mantenidos en el Bioterio de los Laboratorios de “Fecundación in Vitro, Clonaje y Transgenia Animal”. Los ratones fueron mantenidos en condiciones de bioterio: temperatura de 19-22°C y 50% de humedad relativa, con libre acceso a comida balanceada (Nuvilab CR1-Nuvital®, Brasil), agua *ad libitum* y un fotoperiodo de 14/10 horas luz/oscuridad. Los ratones se distribuyeron en dos grupos etarios: 3-4 meses (Grupo joven; G1) y de 18-21 meses (Grupo viejo; G2) (Flurkey *et al.* 2007).

#### **3.1.2 Material Biológico**

Se emplearon espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo para los análisis de movilidad espermática, la fragmentación del ADN mediante el ensayo cometa bidimensional y el estrés oxidativo mediante TBARS. Se utilizó la mitad de un testículo para evaluar la expresión génica de *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2*, mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR).

### **3.2 Evaluación computarizada de la movilidad espermática**

#### **3.2.1 Equipos y procedimiento**

Se usó el Sistema Computarizado: Computer-Assisted Sperm Analyze (CASA) (Hamilton–Thorne Ceros 12.1). Este sistema nos permite obtener un resultado más fiable comparado a la inspección visual de rutina. En resumen, una alícuota de 5  $\mu$ l de muestra espermática se colocó en la cámara de conteo del equipo a 37°C. Se seleccionaron aleatoriamente 5 campos y fueron escaneados 5 veces cada uno. El promedio de los 25 escaneos se usaron para los análisis estadísticos. Se evaluaron las siguientes velocidades de movimiento espermático:

Movilidad Total (**MOT**, VAP > 30  $\mu$ m/s)

Movilidad Progresiva (**MP**, VAP > 50  $\mu$ m/s y rectitud > 70%)

La movilidad total fue dividida en 4 grupos basados en la velocidad de movimiento de los espermatozoides

Movilidad rápida (**MR**, VAP > 50  $\mu$ m/s, %)

Movilidad media (**MM**, 30  $\mu$ m/s < VAP < 50  $\mu$ m/s, %)

Movilidad lenta (**ML**, VAP > 30  $\mu$ m/s o VSL < 15  $\mu$ m/s, %)

Movilidad estática (**ME**, no presenta movimiento)

Se determinaron también los siguientes tipos de velocidades que experimenta el espermatozoide durante su desplazamiento.

**VAP** Velocidad promedio ( $\mu$ m/s), es la velocidad promedio del espermatozoide durante su trayectoria.

**VSL** Velocidad en línea recta ( $\mu$ m/s), es la velocidad promedio en línea recta desde el inicio hasta el final de la trayectoria.

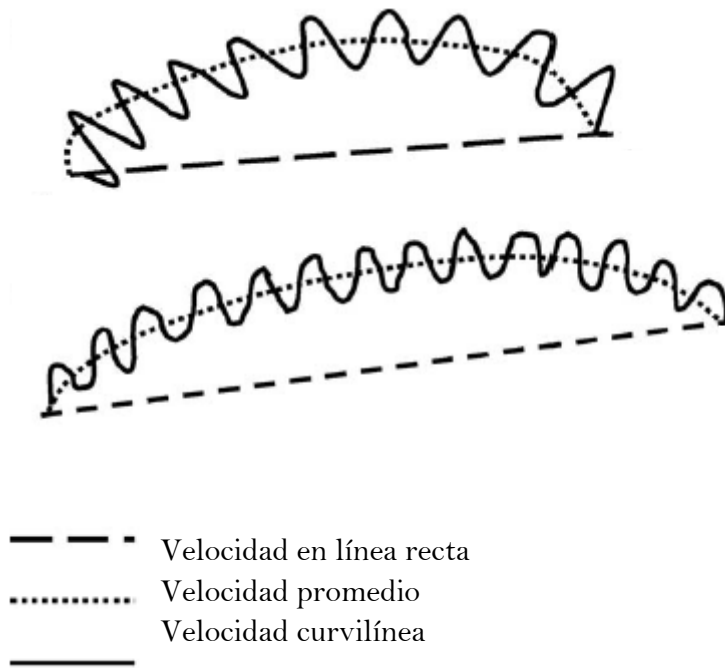
**VCL** Velocidad curvilínea ( $\mu$ m/s), es la velocidad promedio en los puntos reales durante el desplazamiento del espermatozoide.

**ALH** Amplitud de desplazamiento lateral ( $\mu\text{m/s}$ ), es la medida de la amplitud de oscilación de la cabeza espermática.

**BCF** Frecuencia de batido (Hz), es una medida de la frecuencia del movimiento lateral que produce una cabeza espermática cuando cruza el camino promedio.

**STR** Rectitud en el desplazamiento (proporción de VSL/VAP).

**LIN** Linearidad (proporción de VSL/VCL)



**Figura 7.** Tipos de velocidades espermáticas evaluadas por CASA. Modificado de Goovaerts *et al.* (2006).

### 3.3 Ensayo de sustancias relativas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para la determinación de estrés oxidativo se empleó el método colorimétrico de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS, por sus siglas en inglés). La sensibilidad para medir sustancias reactivas al ácido

tiobarbitúrico (TBA, por sus siglas en inglés) ha hecho de este ensayo el método de elección para monitorear la peroxidación lipídica, el principal indicador de estrés oxidativo (Armstrong & Browne 1994; Lefevre *et al.* 1998). El método es basado en la reacción de dos moléculas de TBA con una molécula de malondialdehído (MDA) a altas temperaturas y bajo pH, lo que resulta en un cromógeno rosado que puede ser cuantificado por espectrofotometría. Las muestras biológicas en general tienen una mezcla de TBARS, incluyendo lípidos hidroperóxidos y aldehídos, los cuales incrementan como resultado del estrés oxidativo. TBARS son expresados en forma de equivalentes de MDA (Kwon & Watts 1964)

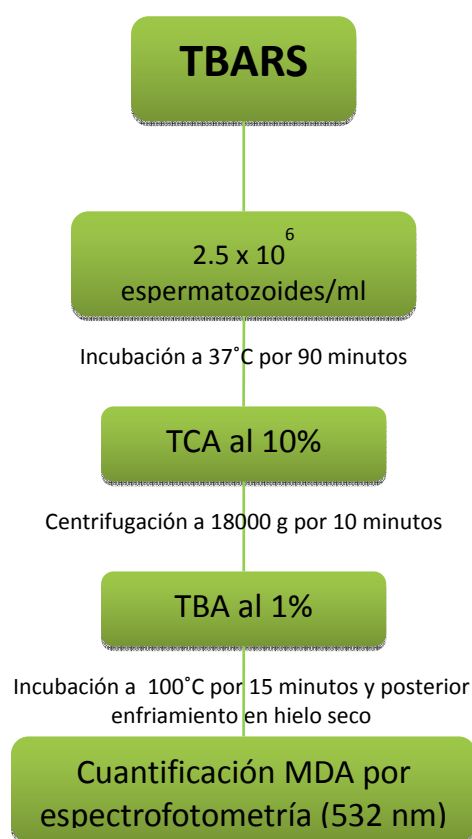
### **3.3.1 Procedimiento**

El ensayo TBARS mide el estrés oxidativo producto de la peroxidación lipídica en las células, mediante la cuantificación de MDA (Fig 8)

Se incubó 400 ul de muestra espermática de cada animal a  $2.5 \times 10^6$  espermatozoides/ml a 37°C por 90 minutos, luego se añadió a cada muestra ácido tricloroacético helado a 10% (TCA 10%) en la proporción de 1:2. Las muestras fueron centrifugadas a 18000 g por 10 minutos para precipitar las proteínas y recuperar el sobrenadante. Todas las muestras se congelaron (-20°C) hasta el momento de la lectura.

En el día de la lectura, se añadió una alícuota de 500 ul de TBA 1% a 500 ul del sobrenadante anteriormente congelado. La mezcla se hirvió (100°C) por 15 minutos y luego se detuvo la reacción por enfriamiento en hielo seco (-78.5°C). El producto que se mide es el MDA. La medición del MDA se realizó en condiciones de alta temperatura y bajo pH (pH < 3), resultando en una solución de coloración rosada. La medición de MDA se realizó en el Laboratorio de “Andrología” del Departamento de Reproducción Animal de la FMVZ-USP por espectrofotometría con longitud de onda de 532 nm y los resultados fueron comparados a una curva patrón hecha con MDA ya

establecida en el laboratorio. La concentración de TBARS se determinó empleando como coeficiente de extinción molar del MDA el valor de  $1.56 \times 10^5 \times \text{M}^{-1} \text{ml}^{-1}$  (Buege & Aust 1978). La peroxidación lipídica se expresa en nanogramos de TBARS  $\times 10^{-6}$  espermatozoides.



**Figura 8.** Flujograma del procedimiento de TBARS.

### **3.4 Ensayo Cometa**

#### **3.4.1 Procedimiento**

Mediante esta técnica las células adquieren una morfología semejante a un cometa, en la cual la cabeza del cometa representa el ADN intacto y la cola los fragmentos del ADN que han migrado. El protocolo del ensayo cometa utilizado es una adaptación de Enciso *et al.* (2009), este protocolo permite

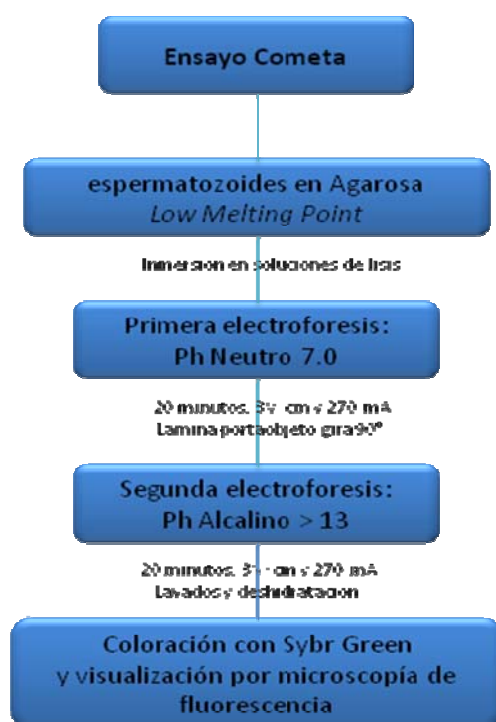
detectar el daño en una hebra, en ambas o al mismo tiempo registrar ambos tipos de daño. El ensayo cometa fue realizado de manera bidimensional en condiciones neutras (pH 7.0) y en condiciones alcalinas (pH > 13) (Figura 9).

En resumen, se cubrieron láminas portaobjetos con una capa de agarosa “*Normal Melting Point*” (NMP). Las láminas de cada individuo se realizaron en duplicado. En cada lámina se adicionaron espermatozoides diluidos en agarosa “*Low Melting Point*” (LMP), se permitió enfriar y se adicionó una segunda capa de agarosa LMP. Posteriormente las láminas se sumergieron en soluciones de lisis y se retiró el exceso por lavados sucesivos en agua pentadestilada. La primera electroforesis fue en condiciones neutras, se sumergieron las láminas en buffer TBE 1X y la electroforesis se realizó durante 20 minutos a 3V/cm y amperaje de 270 mA. La segunda electroforesis fue en condiciones alcalinas, las láminas se sumergieron en solución alcalina por 20 minutos para permitir desenrollar las hebras del ADN, la electroforesis se realizó durante 20 minutos a 3V/cm y amperaje de 270 mA. Posteriormente las láminas fueron lavadas 3 veces con TBE 1X y se deshidrataron sucesivamente con etanol 70%, 92% y 100% y se colorearon con Sybr Green (Invitrogen, Brasil). Las imágenes se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX80 (Tokio, Japón) con filtro de excitación de 515-560 nm y filtro de barrera de 600 nm, equipado con una cámara OLYMPUS Q-Color5 TM de 5 megapíxeles, y aumento de 200X. Las imágenes de 500 cometas de cada animal se seleccionaron aleatoriamente y fueron analizadas utilizando un software de imágenes (Comet Score TM) proporcionado gratuitamente en internet por la empresa TriTek-Corp ([http://autocomet.com/products\\_cometscore.php](http://autocomet.com/products_cometscore.php))

Este programa ofrece un cuadro de medición rectangular para la evaluación de los cometas. Las células pueden ser evaluadas de acuerdo a las siguientes variables: longitud del cometa (número de píxeles en la dirección horizontal del cometa), área del cometa (número de píxeles en el cometa), intensidad promedio del cometa (intensidad promedio de píxeles en el cometa), “Momento Oliva” (suma de los valores de los perfiles de intensidad de píxeles en la cola multiplicado por las distancias relativas con el centro de la cabeza,



dividido por la intensidad total del cometa), intensidad media de la cabeza del cometa (intensidad media de píxeles en la cabeza del cometa), porcentaje de ADN en la cabeza (intensidad total de píxeles en la cabeza, dividido por la intensidad total del cometa, multiplicado por 100), longitud de la cola del cometa (perfil resultante de la resta del perfil de la cabeza menos el perfil del cometa), intensidad media de la cola (intensidad promedio de píxeles en la cola del cometa), porcentaje de ADN en la cola del cometa (intensidad total de la cola dividido por la intensidad del cometa, multiplicado por 100), momento de cola (porcentaje de ADN en la cola multiplicada por la longitud del cometa).



**Figura 9.** Flujograma del procedimiento del ensayo cometa.

### 3.5 Cuantificación relativa de la expresión génica por PCR en tiempo real (RT-qPCR)

En esta investigación se realizó expresión génica relativa, la cual constó de la expresión de los genes *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2* del G2 en relación a su expresión en el G1.

#### 3.5.1 *Primers*

Las secuencias de los *primers housekeeping* (*Gadph* y *Actb*) y experimentales (*Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2*) se resumen en el tabla 1.

GEN	FORWARD 5' - 3'	REVERSE 5' - 3'
<b><i>Gadph</i></b> (Banerjee <i>et al.</i> 2011)	TGACCCCTTCATTGACCTTC	TACTCAGCACCAGCATCACC
<b><i>Actb</i></b> (Delisle <i>et al.</i> 2008)	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT	GGGCAGTGATCTCTTTCTCGC
<b><i>Prm1</i></b> <sup>£</sup>	GCAGAAAAGCAGGAGCAGAT	ACGCAGGAGTTTTGATGGAC
<b><i>Prm2</i></b> <sup>£</sup>	AGAGCGCGTAGAGGACTATG	TGATGGTGCCTCCTACATTT
<b><i>Tnp1</i></b> (Chang <i>et al.</i> 2012)	GAGAGGTGGAAGCAAGAGAAAA	CCCACTCTGATAGGATCTTTGG
<b><i>Tnp2</i></b> (Chang <i>et al.</i> 2012)	GAAGGGAAAGTGAGCAAGAGAA	GCATAGAAATTGCTGCAGTGAC

**Tabla 1.** Secuencias de los *primers*.

<sup>£</sup> Las secuencias de los *primers Prm1* y *Prm2* fueron gentilmente donados para el desarrollo de la presente tesis y son propiedad intelectual del Laboratorio de Fecundación in Vitro, Clonaje y Transgenia Animal, Facultad de Medicina y Veterinaria y Zootecnia- Universidad de Sao Paulo.

### 3.5.2 Procedimiento

#### 3.5.2.1 Extracción de ARN y tratamiento con ADNasas.

La mitad de ambos testículos del ratón se almacenó a -80°C hasta su procesamiento. La extracción del ARN se realizó con el Kit “ILLUSTRA RNAspin Mini RNA Isolation” código: 25-0500-71 según el protocolo establecido por GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido.

En resumen (Figura 10):

Homogenizar la muestra.

Lisis celular: 350 ul RA1 + 3.5 ul β-mercaptoetanol.

Vortex por 20 segundos.

Transferir al filtro rosado y centrifugar 11000 g por 1 minuto.

Descartar el filtro rosado y transferir a un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Adicionar 350 ul de etanol 70%.

Vortex por 5 minutos dos veces.

Pipetear y transferir al filtro azul con tubo colector.

Centrifugar a 8000 g por 30 segundos, cambiar tubo colector.

Adicionar 350 ul de MDB.

Centrifugar a 11000 g por 1 minuto, cambiar tubo colector.

Adicionar 95 ul de solución de ADNasa al filtro azul.

Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.

Adicionar 200 ul de RA2.

Centrifugar a 11000 g por 1 minuto.

Cambiar el tubo colector.

Adicionar 600 ul de RA3.

Centrifugar a 11000 g por 1 minuto y descartar filtrado

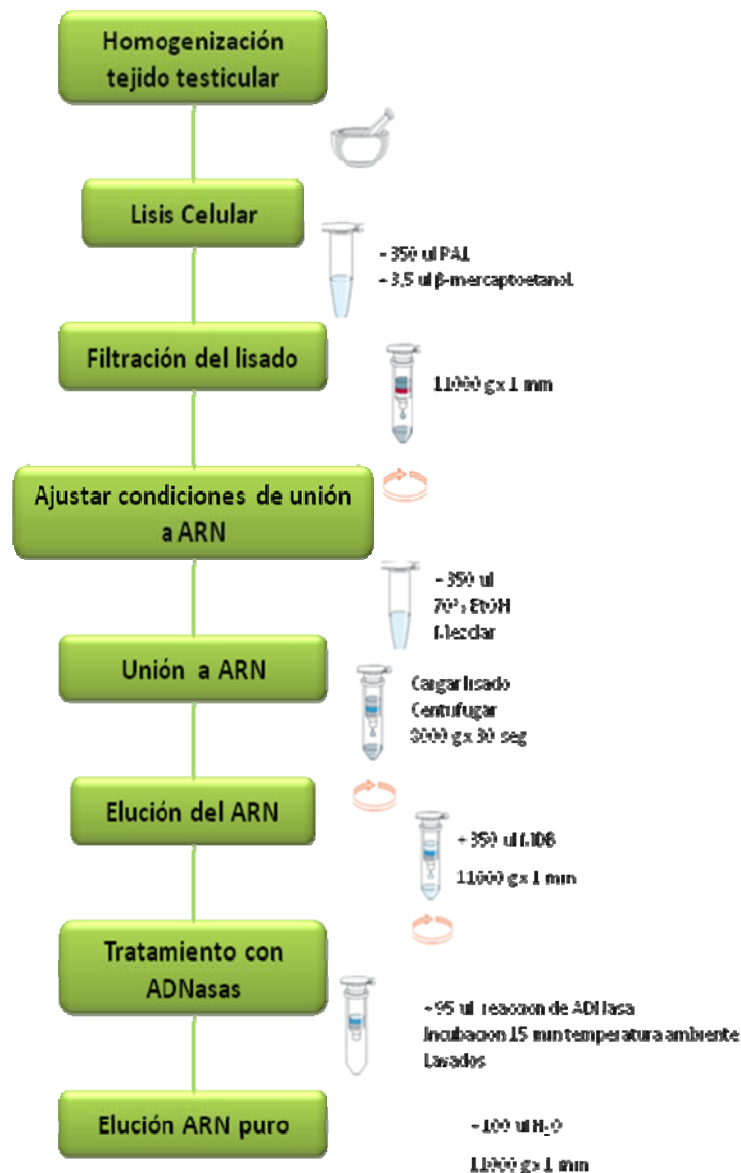
Adicionar 250 ul de RA3.

Centrifugar a 11000 g por 2 minutos.

Transferir filtro a tubo eppendorf de 1.5 ml

Eluir con 40 ul de agua

Eluir de nuevo con 100 ul de agua.



**Figura 10.** Flujograma del procedimiento de extracción de ARN.

### 3.5.2.2 Cuantificación de ácidos nucleicos (ARN y ADNc)

La cuantificación de ARN se realizó en Nanodrop (Nanodrop ND-100, Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington, Delaware, EUA), el cual realiza lecturas de absorbancia a 230, 260 y 280 nm. La proporción 260/280 indica el grado de pureza del ácido nucleico y la proporción 260/230 indica la contaminación por proteínas, fenol u otros compuestos en la muestra. En general, las proporciones  $260/280 = 1.8$  para ARN y  $2.0$  para ADN son resultados adecuados, a su vez una proporción de  $260/230 = 2.0$  para ácidos

nucleicos indica que una muestra presenta niveles mínimos aceptables de contaminación.

### **3.5.2.3 Síntesis de ADNc**

A partir del ARN aislado y libre de ADN genómico contaminante, se sintetizó ADNc, para lo cual se empleó el kit *Superscript® VILO™ cDNA synthesis* de Invitrogen® según instrucciones del proveedor.

En resumen, 4 ul de Buffer de Reacción VILO5X, 2 ul de enzima SuperScript 10X, 2.5 ug ARN y agua ultrapura hasta un volumen final de 20 ul se incubaron por 10 min a 25°C, luego a 42 °C por 60 minutos, terminando la reacción a 85°C por 5 min. El ADNc resultante se diluyó 25 veces en agua ultrapura y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **3.5.2.4 Estandarizaciones**

#### **3.5.2.4.1 Curva de Eficiencia**

Las reacciones de PCR en tiempo real (RT-qPCR) fueron previamente estandarizadas con ADNc testicular. Se hicieron diluciones seriadas a partir de un *master mix* de 20 ul. en base 10, es decir se usó 1/10 de este volumen (2 ul) como *template* del siguiente *master mix*, y así sucesivamente, obteniéndose 5 *master mix* a distintas concentraciones de *template*. Los *master mix* tuvieron 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> ng de ADNc, los cuales fueron amplificados en triplicado. Los valores idóneos son:  $\Delta C_T = 3.4$ , eficiencia mínima = 0.97 y un R<sup>2</sup> mínimo = 0.99.

#### **3.5.2.4.2 Curva de Disociación**

Se verificó la especificidad del producto amplificado mediante una curva de disociación (*Melting Curve*), la cual nos muestra si la amplificación es específica de nuestro gen por la formación de un solo pico de fluorescencia.

### **3.5.2.5 Reacción de PCR**

El análisis de PCR en tiempo real se realizó con el sistema de detección ABI Prism ® 7500 utilizando el Kit Supermix Universal SYBR Green™ qPCR con 25 µl de volumen final. Como control endógeno se utilizaron dos genes: *Gadph* y *Actb*. En todas las amplificaciones se usó el siguiente programa de 3 pasos: 95°C/15 seg, 55°C/15 seg y 68°C/20 seg por 45 ciclos, seguido de la curva de disociación. Como control negativo de la reacción se usó un mix de reacción con sus respectivos *primers*, pero el ADNc correspondiente fue reemplazado por H<sub>2</sub>O. Todas las reacciones se realizaron en triplicado. Como control interno durante la utilización del equipo en las distintas veces que se usó durante la investigación, se amplificó siempre un gen bien estandarizado. La variación entre las réplicas no puede ser mayor a 10% (CV≤10).

### 3.6 Análisis estadístico

Se comprobó homocedasticidad (igualdad de varianzas) de los datos mediante el Test de Levene. Para comprobar si los datos obtenidos de las distintas variables a evaluar se distribuían normalmente se realizó la prueba de Shapiro-Wilk. Cuando la variable a evaluar presentaba distribución normal se procedió a comparar las medias con t-Student, en caso contrario se aplicó U de Mann-Whitney para pruebas no paramétricas. Los resultados fueron expresados como media ± EE (error estándar). Se usó el programa estadístico SPSS Ver 17.00, considerando el nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Movilidad espermática

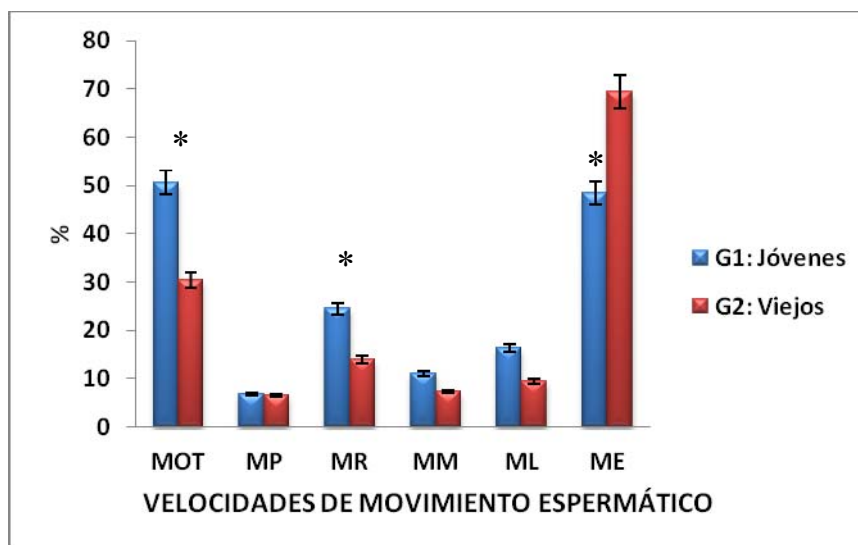
Los resultados obtenidos respecto a las velocidades de movimiento espermático se presentan en la Tabla 2.

Velocidades de movimiento	G1 (n=8)	G2 (n=13)
MOT *	50.62 ± 6.60	30.38 ± 5.16

<b>MP</b>	6.75 ± 1.03	6.46 ± 3.02
<b>MR *</b>	24.50 ± 3.04	13.92 ± 3.02
<b>MM</b>	11.00 ± 5.07	7.30 ± 3.69
<b>ML</b>	16.38 ± 2.87	9.46 ± 1.94
<b>ME *</b>	48.38 ± 7.39	69.31 ± 5.31

**Tabla 2.** Velocidades de movimiento de los espermatozoides medidos por CASA entre ambos grupos de estudio. MOT: total, MP: progresiva, MR: rápida, MM: media, ML: lenta, ME: estática. Medias (%) ± EE. \* indica significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

Se observó que el G1 presenta mayores valores que G2, en cuanto a MOT ( $50.63 \pm 6.60$  % vs  $30.38 \pm 5.16$  %,  $p < 0.05$ ) y MR ( $24.50 \pm 3.04$  % vs  $13.92 \pm 3.02$  %,  $p < 0.05$ ), mientras que los espermatozoides con ME se encuentran en mayor proporción en el G2 respecto al G1 ( $69.31 \pm 5.31$  % vs  $48.38 \pm 7.39$  %,  $p < 0.05$ ). G1 y G2 no presentaron diferencias en MP ( $6.75 \pm 1.03$  % vs  $6.46 \pm 3.02$  %,  $p > 0.05$ ), MM ( $11.00 \pm 5.07$  % vs  $7.30 \pm 3.69$  %,  $p > 0.05$ ) y ML ( $16.38 \pm 2.87$  % vs  $9.46 \pm 1.94$  %,  $p > 0.05$ ) (Figura 11).



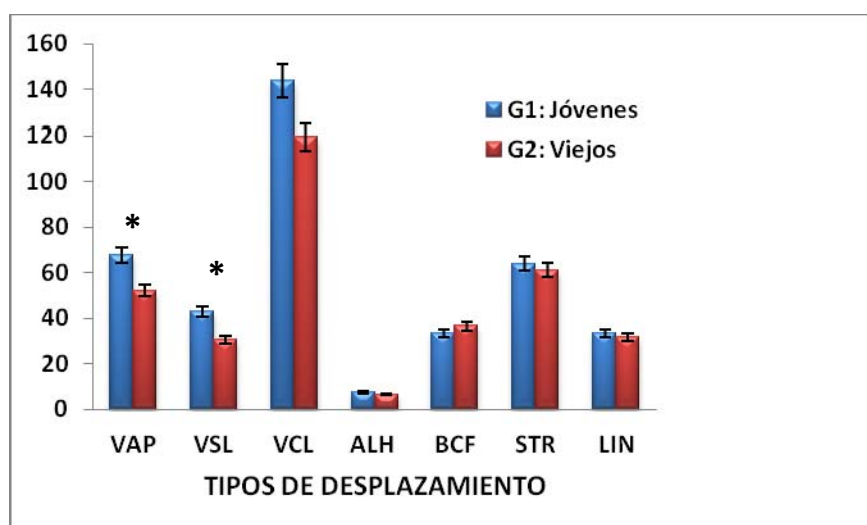
**Figura 11.** Velocidades de movimiento espermático medido con CASA. Eje X; velocidades de movimiento espermático: MOT: total, MP: progresiva, MR: rápida, MM: media, ML: lenta, ME: estática. Barras representan media ± EE. \* indica significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos respecto a los tipos de desplazamiento de los espermatozoides se presentan en la Tabla 3.

Tipos de desplazamiento	G1 (n=8)	G2 (n=13)
VAP *	67.89 ± 5.68	52.12 ± 3.38
VSL *	43.15 ± 3.47	30.68 ± 2.45
VCL	143.88 ± 12.25	119.32 ± 8.05
ALH	7.46 ± 0.61	6.59 ± 0.31
BCF	33.29 ± 0.88	36.58 ± 1.31
STR	64.00 ± 1.88	61.23 ± 3.46
LIN	33.25 ± 1.59	31.85 ± 2.23

**Tabla 3.** Tipos de desplazamiento de los espermatozoides medidos por CASA entre ambos grupos de estudio. VAP: velocidad promedio ( $\mu\text{m/s}$ ), VSL: velocidad en línea recta ( $\mu\text{m/s}$ ), VCL: velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), ALH: amplitud de desplazamiento lateral ( $\mu\text{m/s}$ ), BCF: frecuencia de batido (Hz), STR: rectitud en el desplazamiento, LIN: linealidad. Medias (%)  $\pm$  EE. \* indica significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

Se observó que G1 presentó mayores valores que G2, en cuanto a VAP ( $67.89 \pm 5.68$  % vs  $52.12 \pm 3.38$  %,  $p < 0.05$ ) y VSL ( $43.15 \pm 3.47$  vs  $30.68 \pm 2.45$ ,  $p < 0.05$ ). G1 y G2 no presentaron diferencias en cuanto a VCL ( $143.88 \pm 12.25$  % vs  $119.32 \pm 8.05$  %,  $p > 0.05$ ), ALH ( $7.46 \pm 0.61$  % vs  $6.59 \pm 0.31$  %,  $p > 0.05$ ), BCF ( $33.29 \pm 0.88$  % vs  $36.58 \pm 1.31$  %,  $p > 0.05$ ), STR ( $64.00 \pm 1.88$  % vs  $61.23 \pm 3.46$  %,  $p > 0.05$ ) y LIN ( $33.25 \pm 1.59$  % vs  $31.85 \pm 2.23$  %,  $p > 0.05$ ) (Figura 12).

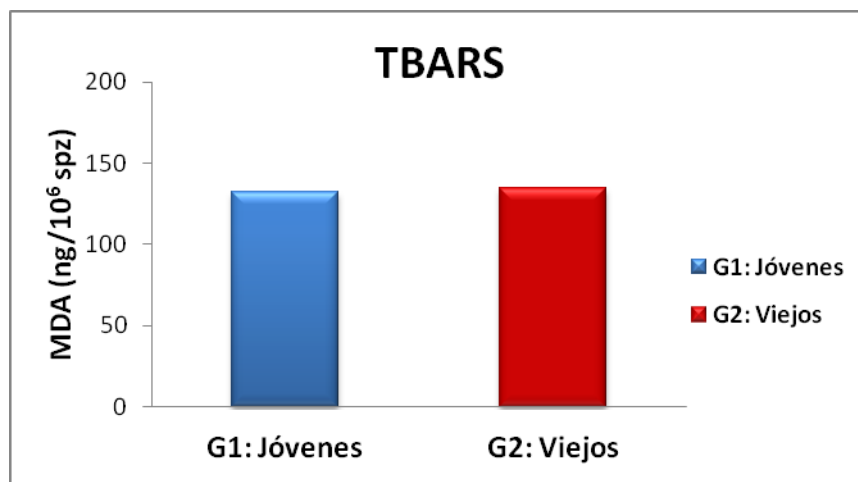




**Figura 12.** Tipos de desplazamiento de los espermatozoides medidos con CASA. Eje X; tipos de desplazamiento: VAP: velocidad promedio ( $\mu\text{m/s}$ ), VSL: velocidad en línea recta ( $\mu\text{m/s}$ ), VCL: velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), ALH: amplitud de desplazamiento lateral ( $\mu\text{m/s}$ ), BCF: frecuencia de batido (Hz), STR: rectitud en el desplazamiento, LIN: linealidad. Barras representan media  $\pm$  EE. \* indica significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

## 4.2 TBARS

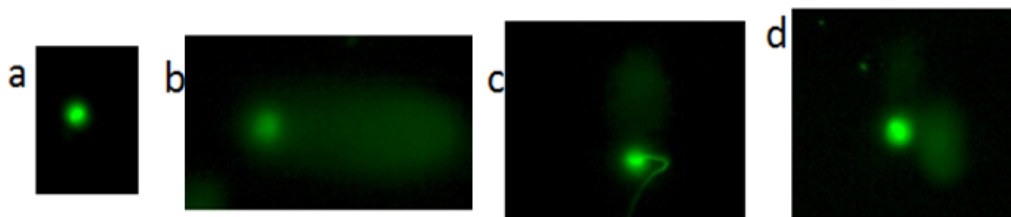
TBARS no presentó diferencias entre el G1 y G2 ( $132.50 \pm 9.64$  ng MDA/ $10^6$  spz vs  $135.00 \pm 10.81$  ng MDA/ $10^6$  spz;  $p > 0.05$ ) (Figura 13).



**Figura 13.** Cuantificación de MDA mediante el ensayo TBARS. Barras representan media  $\pm$  EE. spz = espermatozoides

## 4.3 Ensayo cometa bidimensional

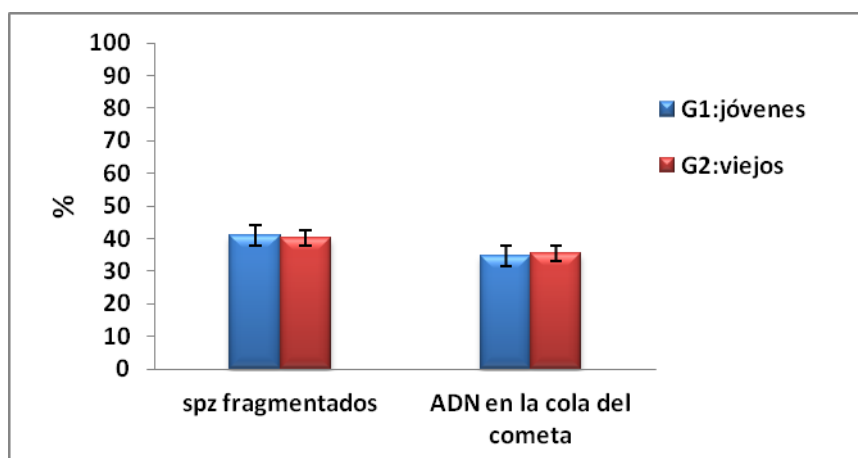
Se pudo observar los 3 tipos de fragmentación al ADN espermático mediante el ensayo cometa bidimensional (Figura 14).



**Figura 14.** Tipos de fragmentación del ADN espermático evaluados. Se visualiza espermatozoide a) sin fragmentación, b) fragmentación de una sola

hebra, c) fragmentación de doble hebra y d) ambos tipos de fragmentación (hebra única y doble) simultáneamente. Se usó el fluoróforo Sybr Green. Aumento 400X.

No se observaron diferencias significativas en la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado entre los grupos G1 y G2 ( $20.51 \pm 1.41 \%$  vs  $20.11 \pm 1.29 \%$ ,  $p > 0.05$ ), ni en la cantidad de ADN fragmentado en ambos grupos ( $17.36 \pm 0.49 \%$  vs  $17.76 \pm 0.62 \%$ ,  $p > 0.05$ ) (Figura 15).



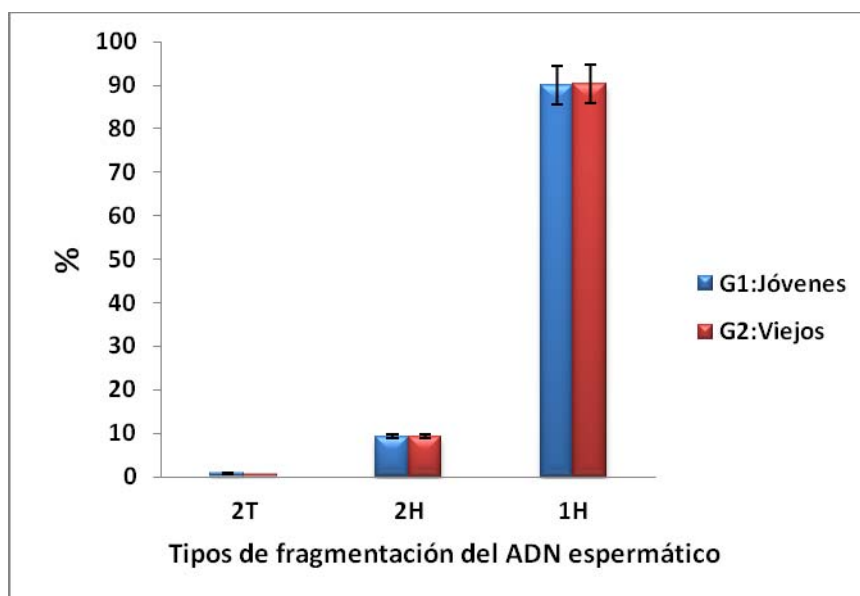
**Figura 15.** Proporción de espermatozoides con ADN fragmentado y cantidad de ADN en la cola del cometa. Barras representan media  $\pm$  EE. spz = espermatozoides.

En cuanto al tipo de fragmentación encontrado en el ADN espermático, se dividió en 3 grupos: fragmentación de una sola hebra (1H), fragmentación de doble hebra (2H), y ambos tipos de fragmentación (2T). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.

Tipo de Fragmentación	G1 (n=8)	G2 (n=13)
2T	0.77 $\pm$ 0.28	0.53 $\pm$ 0.21
2H	9.18 $\pm$ 1.35	9.18 $\pm$ 1.77
1H	90.05 $\pm$ 4.31	90.29 $\pm$ 5.72

**Tabla 4.** Tipo de fragmentación del ADN espermático mediante el ensayo cometa bidimensional. 1H = fragmentación de una sola hebra, 2H = fragmentación de doble hebra, 2T = ambos tipos de fragmentación. Media (%)  $\pm$  EE.

No se encontraron diferencias significativas en ningún tipo de fragmentación entre G1 y G2; 1H ( $90.05 \pm 4.31$  % vs  $90.29 \pm 5.72$  %,  $p>0.05$ ), 2H ( $9.18 \pm 1.35$  % vs  $9.18 \pm 1.77$ ,  $p>0.05$ ) y 2T ( $0.77 \pm 0.28$  vs  $0.53 \pm 0.21$ ,  $p>0.05$ ) (Figura 16).



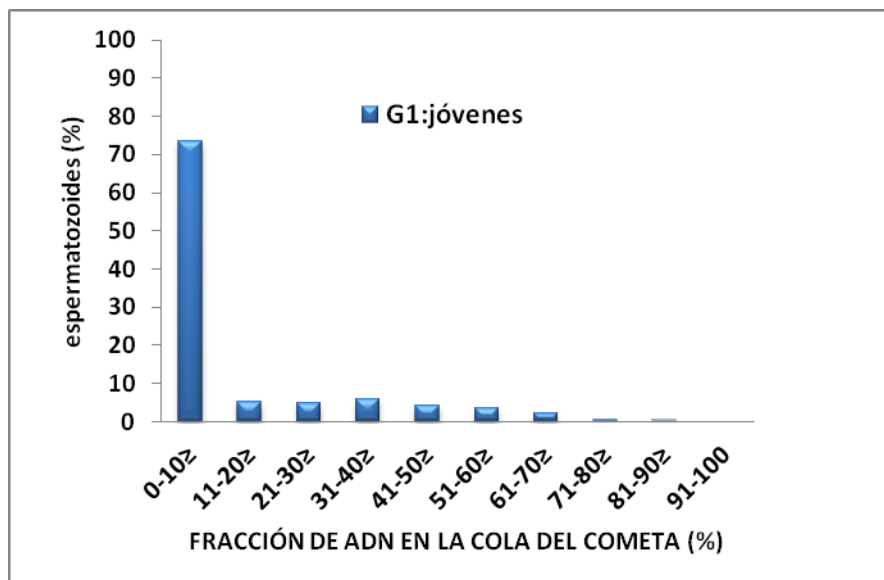
**Figura 16.** Distribución de los tipos de daño en el ADN espermático mediante el ensayo cometa bidimensional. 1H = fragmentación de una sola hebra, 2H = fragmentación de doble hebra y 2T = ambos tipos de fragmentación. Barras representan media  $\pm$  EE.

La distribución del porcentaje de ADN fragmentado en cada espermatozoide del G1 se presenta en la Tabla 5.

% ADN fragmentado	% espermatozoides
0-10 $\geq$	73.54
11-20 $\geq$	5.06
21-30 $\geq$	4.79
31-40 $\geq$	6.02
41-50 $\geq$	4.34
51-60 $\geq$	3.63
61-70 $\geq$	2.23
71-80 $\geq$	0.36
81-90 $\geq$	0.03
91-100	0.00

**Tabla 5.** Distribución del grado de fragmentación espermática dentro del G1. Se analizaron 250 espermatozoides.

Esta distribución fue de amplio rango, la mayor cantidad de espermatozoides (73.54%) presentaron un daño menor al 10 %. La distribución de los demás proporciones de fragmentación se presentaron con menor frecuencia (Figura 17).



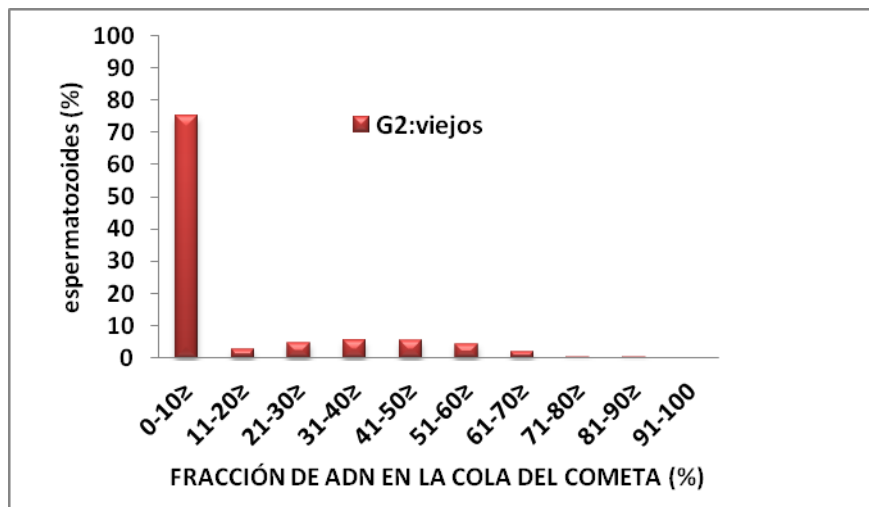
**Figura 17.** Distribución del % de ADN fragmentado en los espermatozoides del G1.

La distribución del porcentaje de ADN fragmentado en cada espermatozoide del G2 se presenta en la Tabla 6.

% ADN fragmentado	% espermatozoides
0-10≥	75.14
11-20≥	2.57
21-30≥	4.69
31-40≥	5.61
41-50≥	5.43
51-60≥	4.19
61-70≥	1.99
71-80≥	0.36
81-90≥	0.02
91-100	0.00

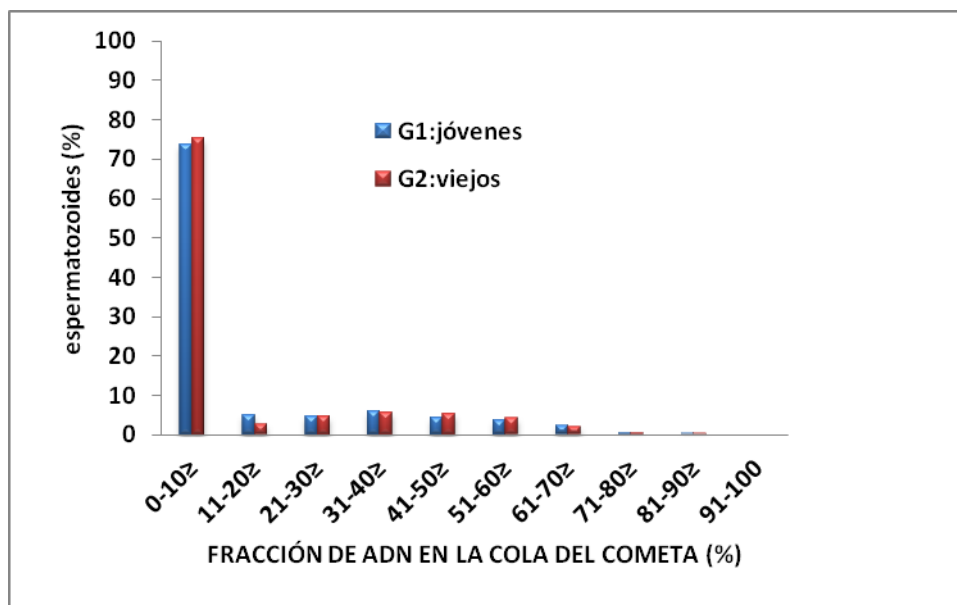
**Tabla 6.** Distribución del grado de fragmentación espermática dentro del G2. Se analizaron 250 espermatozoides.

Esta distribución fue de amplio rango, la mayor cantidad de espermatozoides (75.14%) presentaron un daño menor al 10 %. La distribución de las demás proporciones de fragmentación se presentaron con menor frecuencia (Figura 18).



**Figura 18.** Distribución del % de ADN fragmentado en los espermatozoides del G2.

Las distribuciones de fragmentación al ADN espermático no presentan diferencias significativas entre ambos grupos, ilustrado en la Figura 19.



**Figura 19.** Comparación del % de ADN fragmentado en los espermatozoides del G1 y G2.

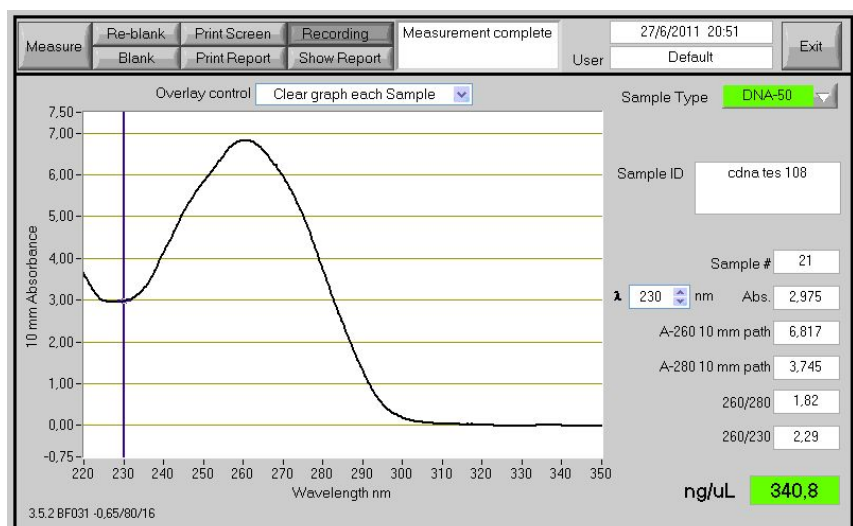
#### 4.4 Expresión génica.

##### 4.4.1 Extracción de ARN.

El ARN extraído de 21 ratones presentó excelentes valores:  $260/280 = 2.07 (\pm 0.005; EE)$  y  $260/230 = 1.92 (\pm 0.084; EE)$ .

##### 4.4.2 Síntesis de ADNc

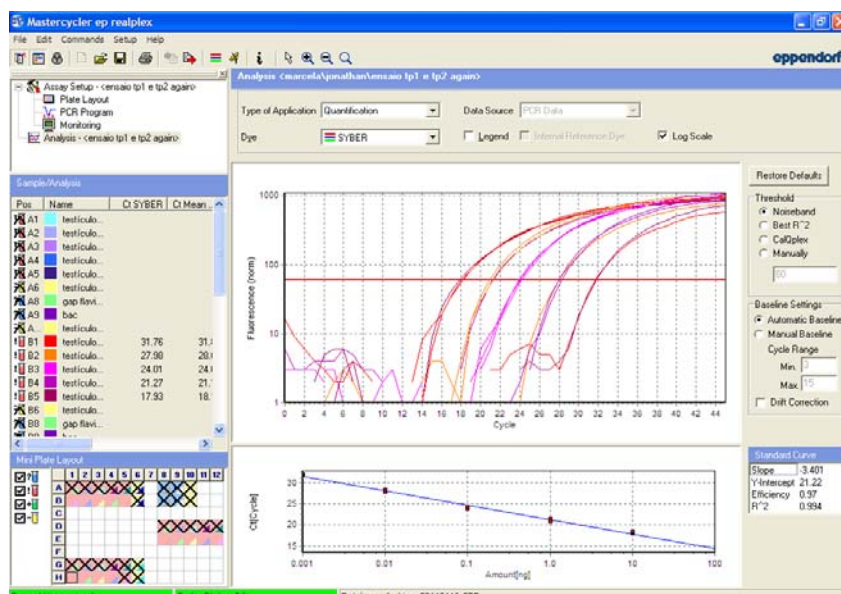
Se sintetizó ADNc de los 21 ratones antes mencionados y para cuantificarlo y verificar su pureza se procedió de la misma manera que con el ARN del paso anterior. Se encontraron excelentes valores:  $260/280 = 1.82 (\pm 0.002; EE)$  y  $260/230 = 2.24 (\pm 0.015; EE)$ . En la figura 20 se muestra un ejemplo de la cuantificación de ácidos nucleicos con el equipo Nanodrop. En el eje X se disponen las longitudes de onda y en el eje Y las absorbancias. La elevación de la curva a la altura de 260nm indica que se realizó una medición a esa absorbancia. Se muestran también mediciones anteriores a 230nm y 280nm, así como las proporciones  $260/280$  y  $260/230$ .



**figura 20.** Cuantificación de ácidos nucleicos con el sistema Nanodrop. Se muestran las lecturas de absorbancias a 230, 260 y 280 nm y la cantidad de ng/uL de ADNc. Se usó este sistema para medir ARN y ADNc.

#### 4.4.3 Curvas de eficiencia

Se realizaron las curvas de eficiencia para los 6 *primers*. En la figura 21 se presenta como ejemplo las curvas de eficiencia para el gen *Tnp2*. El programa *Mastercycler ep realplex* nos presenta una plataforma bastante amigable, al lado izquierdo se observa las muestras que están siendo analizadas y a la derecha la amplificación de las mismas. En el eje X de la ventana de amplificación se observa la cantidad de ciclos y en el eje Y la cantidad de fluorescencia emitida por lo cual se puede observar en tiempo real como la fluorescencia va aumentando a medida que aumentan los ciclos hasta llegar a una meseta donde la fluorescencia no aumentará más. La fluorescencia solo será leída por el equipo cuando supere el umbral (línea roja), todo lo que está por debajo del umbral el equipo lo considera como ruido. Se consideraron 5 amplificaciones con cantidad distinta de ADNc (10-fold) y se corrieron en triplicado. A la derecha se observa que al terminar la amplificación la eficiencia para este gen es de 0.97 lo cual es perfecto.



Fi

**gura 21.** Curvas de eficiencia para la amplificación de *Tnp2*. Se observa la amplificación de 5 muestras de ADNc de testículo de ratón a 5 concentraciones distintas (10-fold).

Las eficiencias de todos los genes en estudio se resumen en el Tabla 7.

Gen	<i>Gadph</i>	<i>Actb</i>	<i>Prm1</i>	<i>Prm2</i>	<i>Tnp1</i>	<i>Tnp2</i>
Eficiencia	0.99	0.98	0.95	0.99	0.98	0.97

**Tabla 7.** Eficiencia de los genes en estudio.

#### 4.4.4 Cuantificación de la expresión génica

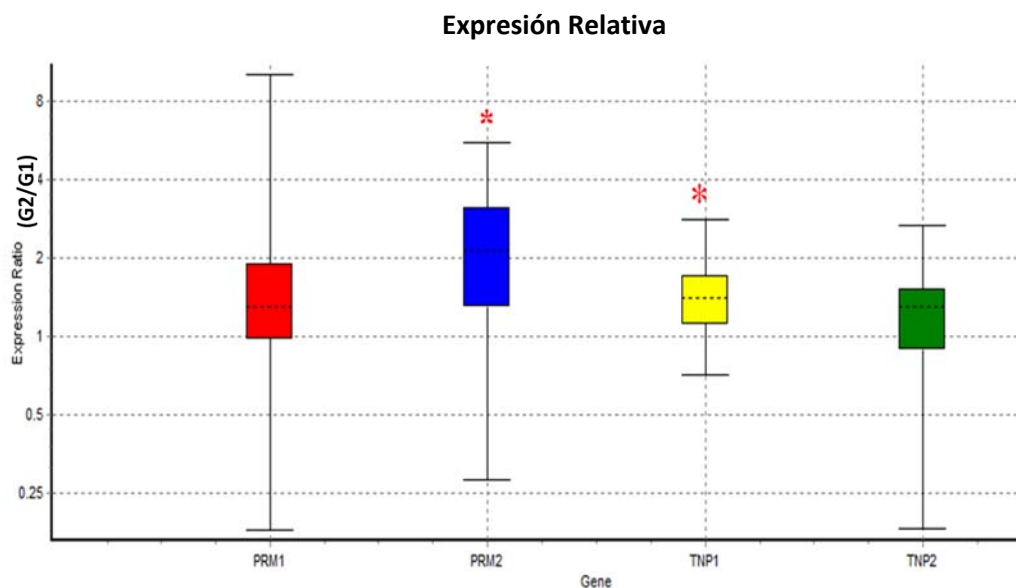
Los resultados de la expresión génica relativa de *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2* usando *Gadph* como gen *housekeeping* fueron los siguientes:

- *Prm1* se expresó 1.604 veces en el G2 respecto al G1, sin observar significancia,  $p=0.110$ . Los valores de expresión se encontraron en un rango de  $[0.872 - 5.742]$ .
- *Prm2* se expresó 1.938 veces en el G2 respecto al G1, siendo una diferencia significativa,  $p=0.007$ . Los valores de expresión se encontraron en un rango de  $[0.942 - 3.643]$ .



- *Tnp1* se expresó 1.397 veces en el G2 respecto al G1, siendo una diferencia significativa,  $p=0.004$ . Los valores de expresión se encontraron en un rango de  $[1.033 - 1.941]$ .
- *Tnp2* se expresó 1.056 veces en el G2 respecto al G1, sin observar significancia,  $p=0.799$ . Los valores de expresión se encontraron en un rango de  $[0.719 - 1.709]$ .

La figura 22 muestra la expresión relativa de los genes *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2* usando como gen *housekeeping* a *Gadph*. Para los cálculos de expresión relativa se consideró la expresión de los genes en estudio del G2 en relación a su expresión en el G1. La comparación de los niveles de expresión de estos genes demostró que *Prm2* y *Tnp1* en el G2 se sobreexpresaron significativamente respecto al G1 ( $p<0.05$ ), sin embargo *Prm1* y *Tnp2* no mostraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ).

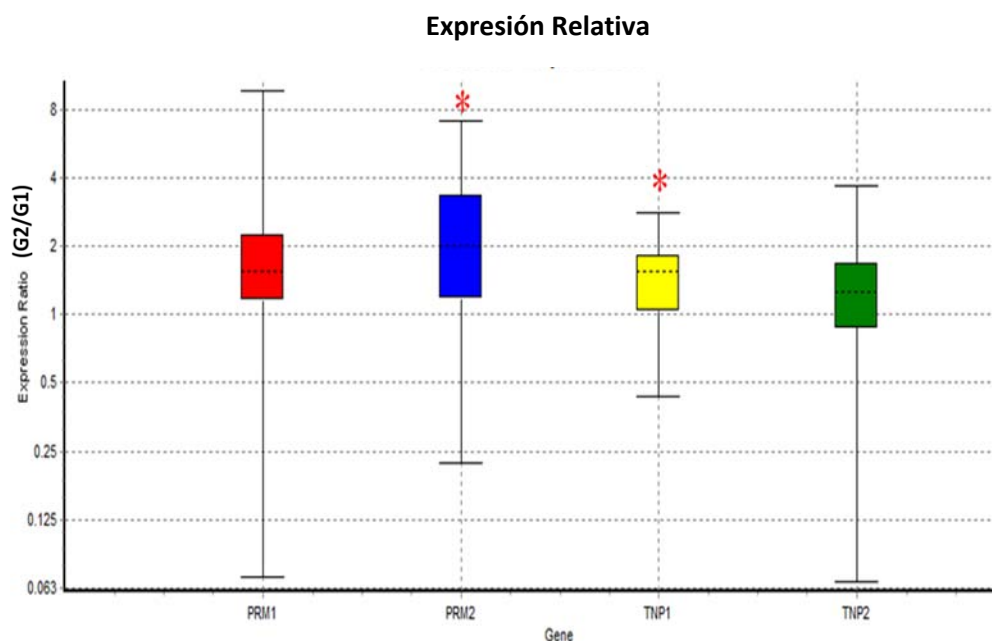


**Figura 22.** Expresión relativa de los genes *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2* usando *Gadph* como *housekeeping*. Expresión del G2 en relación al G1. \* indica significancia estadística ( $p<0.05$ ). Eje X: genes de estudio. Eje Y: valores de la cuantificación de la expresión relativa de los genes de estudio.

Los resultados de la expresión génica relativa de *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2* usando *Actb* como gen *housekeeping* fueron los siguientes:

- *Prm1* se expresó 1.597 veces en el G2 respecto al G1, sin observar significancia,  $p=0.198$ . Los valores de expresión se encuentran en un rango de  $[1.011 - 4.954]$ .
- *Prm2* se expresó 1.930 veces en el G2 respecto al G1, siendo significativa,  $p=0.014$ . Los valores de expresión se encuentran en un rango de  $[0.934 - 4.299]$ .
- *Tnp1* se expresó 1.391 veces en el G2 respecto al G1, siendo significativa,  $p=0.041$ . Los valores de expresión se encuentran en un rango de  $[0.953 - 2.033]$ .
- *Tnp2* se expresó 1.051 veces en el G2 respecto al G1, sin observar significancia,  $p=0.845$ . Los valores de expresión se encuentran en un rango de  $[0.414 - 1.946]$ .

En la figura 23 se observa la expresión relativa de los genes *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2* usando como gen *housekeeping* a *Actb*. Para los cálculos de expresión relativa se consideró la expresión de los genes en estudio del G2 en relación a su expresión en el G1. La comparación de la expresión de estos genes demostró que *Prm2* y *Tnp1* en el G2 se sobreexpresan significativamente respecto al G1 ( $p<0.05$ ), sin embargo *Prm1* y *Tnp2* no mostraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Estos resultados usando *Actb* como *housekeeping* soportan los anteriores resultados utilizando *Gadph* (Figura 22).



**Figura 23.** Expresión relativa de los genes *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2* usando *Actb* como *housekeeping*. Expresión del G2 en relación al G1. \* indica significancia estadística ( $p < 0.05$ ). Eje X: genes de estudio. Eje Y: valores de la cuantificación de la expresión relativa de los genes de estudio.

## 5. DISCUSIÓN

En los mamíferos, la edad se ha relacionado con la disminución de distintas capacidades fisiológicas. Aunque generalmente se ha aceptado que la fertilidad masculina no es afectada con el aumento de la edad, varios estudios recientes han proporcionado información contradiciendo dicha apreciación, siendo de amplia aceptación la disminución de valores fisiológicos espermáticos como movilidad y volumen, mientras las anomalías morfológicas incrementan (Plas *et al.* 2000; Kidd *et al.* 2001). En esta tesis se estudió células masculinas en dos grupos definidos de ratones: jóvenes y viejos, a nivel fisiológico y molecular.

## **Disminución de la movilidad espermática**

La presente investigación definió de manera precisa mediante un sistema computarizado las diferencias en la movilidad espermática entre ambos grupos de estudio. Debido a que la MOT disminuyó en los ratones viejos y dentro de las velocidades de movimiento la MR disminuyó significativamente y ME aumentó, podemos afirmar que son estos tipos de velocidad de movimiento los que contribuyen en mayor proporción sobre la MOT en los ratones, contrariamente a la MM y ML que no difieren entre ambos grupos. La movilidad espermática es una característica de suma importancia para lograr la fertilización (Bedford 1983) por lo cual su disminución podría conllevar a problemas reproductivos. Se ha reconocido a un espermatozoide como normal cuando se traslada linealmente, pero bajo ciertas condiciones, los espermatozoides pueden hacerlo con cierta desviación angular que acortará la longitud total de su desplazamiento, disminuyendo así sus opciones de alcanzar el ovocito (Yanagimachi 1970; Fraser 1977; Cummins 1982; Olds-Clarke 1983). Debido a que esta es la primera investigación que relaciona la edad y movilidades espermáticas en ratones, es imposible discutir los resultados en la misma especie. Sin embargo, este aspecto ha sido ampliamente revisado en humanos y en concordancia con lo expuesto anteriormente la MOT también disminuye a una edad avanzada (Kidd *et al.* 2001; Eskenazi *et al.* 2003; Bellver *et al.* 2008). La disminución en la MOT podría deberse a cambios a nivel fisiológico o celular en el tracto reproductor, disminución de la actividad espermatogénica, incremento en la degeneración de las células germinales y disminución del número y función de las células de Leydig, cambios que se han observado en relación al aumento de la edad (Bishop 1970; Johnson *et al.* 1984). Además puede haber cambios en el epidídimo en relación al aumento de la edad, este órgano es fuertemente sensible a las hormonas y juega un rol importante en la maduración espermática y es donde el espermatozoide adquiere la capacidad de moverse progresivamente (Hamilton & Naftolin 1981). De esta manera la senescencia hormonal o en el epidídimo podrían conllevar a disminuir la movilidad espermática. Debido a que estas causas han sido investigadas en humanos, se

requieren más trabajos que puedan permitirnos entender las causas exactas de la disminución de la movilidad espermática en ratones viejos.

### **La producción de ROS no es alterada**

Los niveles bajos y regulados de ROS han sido implicados en los eventos de capacitación espermática, reacción del acrosoma e interacción con el ovocito (de Lamirande *et al.* 1997; Ford 2004). Sin embargo, cuando el equilibrio fisiológico entre la producción de ROS y su degradación es alterada, el estrés oxidativo producto de este desbalance causa complicaciones reproductivas (Iwasaki & Gagnon 1992). En esta tesis se intentó demostrar alguna alteración en la producción de ROS por los espermatozoides de ratones viejos debido a que ha sido reportado en humanos y ratas que los niveles de antioxidantes son alterados y que la remoción de ROS es menos eficaz durante el envejecimiento (Hazelton & Lang 1985; Rebrin *et al.* 2004; Zubkova & Robaire 2004; Morrison *et al.* 2005). Sin embargo, los resultados indicaron que los espermatozoides de los ratones viejos no son más susceptibles al daño por peroxidación lipídica por lo que podríamos hipotetizar que en esta especie las estrategias para proteger los gametos masculinos contra el daño por ROS son más eficaces que en otras. Además, si bien un alto nivel de ROS disminuye el movimiento de los espermatozoides (Agarwal *et al.* 2008) a través de varios mecanismos como la alteración de los canales de calcio debido a la peroxidación de la membrana (Ren *et al.* 2001; Sakata *et al.* 2002) y la disminución de las reservas de ATP del espermatozoide (Armstrong *et al.* 1999; de Lamirande & Gagnon 1992), la disminución de la movilidad espermática observada en este estudio debería ser originada por otro factor. La producción de ROS podría deberse a una inadecuada compactación del núcleo espermático durante la espermiogénesis, haciéndolo accesible a mutágenos y agentes exógenos que pueden dañar la estructura genómica del ADN (Aitken *et al.* 2009). La importancia de evaluar el contenido de ROS se debe a que el espermatozoide está fuertemente compactado, impidiendo esta estructura algún evento apoptótico, por lo cual el daño al ADN sería

principalmente por estrés oxidativo. Esta conclusión se apoya en la conocida capacidad del espermatozoide humano para generar ROS (Aitken & Clarkson 1987; Aitken *et al.* 1998), la capacidad comprobada de ROS para inducir daño al ADN espermático (Bennetts & Aitken 2005) y la fuerte correlación que existe entre el daño al ADN en estas células y la presencia de 8-hidroxi-2-deoxyguanosina (8OHdG), este último es un marcador sensible de ataque oxidativo al ADN y es un claro indicador que el estrés oxidativo es el principal inductor de daño al ADN en la línea germinal masculina.

### **Los niveles de fragmentación del ADN espermático no son alterados**

En este trabajo, mediante el ensayo cometa bidimensional se demuestra que no existe un mayor porcentaje de ADN espermático fragmentado en los ratones viejos, ni siquiera una alteración entre los tipos de daños detectados, lo cual estaría en fuerte concordancia con la carencia de diferencias en los niveles de estrés oxidativo entre ambos grupos. En el remodelamiento de la cromatina durante la espermiogénesis, se forman roturas temporales en el ADN que luego deben ser reparadas, de manera contraria, se produce daño al ADN (Muratori *et al.* 2006). No existen reportes en la especie que permitan discutir estos resultados, sin embargo, en humanos se ha reportado el aumento de la fragmentación del ADN espermático en relación a la edad, lo que repercute sobre varios parámetros reproductivos (Singh *et al.* 2003; Moskovtsev *et al.* 2007; Schmid *et al.* 2007; Vagnini *et al.* 2007; Hammiche *et al.* 2011). Una posible explicación a la presencia de fragmentación del ADN y estrés oxidativo en humanos y a su carencia en ratones, serían las diferencias en la estructura de su cromatina espermática. En humanos, las protaminas reemplazan el 80% de las histonas nucleares del espermatozoide durante la espermiogénesis (Tanphaichitr *et al.* 1978), mientras que en los ratones este intercambio alcanza el 97% (Bench *et al.* 1996), de manera que el ADN espermático murino presenta un grado de compactación aún más fuerte que los humanos. Se ha demostrado mediante el

ensayo cometa neutro y alcalino que el daño inducido sobre el ADN espermático con 1U/ml de ADNasas en humanos es el mismo que se puede inducir con dosis tan altas como 1000U/ml en ratones (Villani *et al.* 2010). Estas diferencias en la estructura de la cromatina podrían ser responsables de la susceptibilidad al daño del ADN espermático por algún agente externo (Bennetts & Aitken 2005) y a su vez alterar los resultados obtenidos usando diferentes ensayos para medir la fragmentación del ADN (Mitchell *et al.* 2011). Al considerarse el estrés oxidativo un paso inicial de daño al espermatozoide y la fragmentación del ADN un paso final, los resultados obtenidos son congruentes.

### **Alteraciones en los niveles de expresión génica**

En esta investigación se cuantificaron los niveles de expresión génica de las proteínas nucleares del espermatozoide, protaminas y proteínas de transición nuclear, se compararon entre ambos grupos y se demostró la sobreexpresión de *Prm2* y *Tnp1* en el grupo de ratones viejos. Debido a que el núcleo espermático está fuertemente compactado por las protaminas, adquiriendo de esta manera una forma más hidrodinámica (Oliva & Dixon 1991) que le proporciona mayor velocidad durante su desplazamiento, hipotetizamos una posible relación entre la alteración de la expresión de las proteínas nucleares del espermatozoide y la movilidad espermática observada en este estudio. En humanos las deficiencias en la expresión de protaminas se han asociado con infertilidad (de Yebra *et al.* 1993; Carrell & Liu 2001; Aoki *et al.* 2005a). Algunos estudios han descrito poblaciones masculinas infértiles con proporciones anormalmente elevadas de P1/P2 (Balhorn *et al.* 1988; Chevaillier *et al.* 1990; de Yebra *et al.* 1993; Carrell & Liu 2001; Aoki *et al.* 2005a) o con alteración en la expresión de P1 y proporciones P1/P2 anormalmente reducidas (Aoki *et al.* 2005a) e incluso se ha reportado una pequeña población de hombres infértiles con ausencia completa de P2 (Carrell & Liu 2001; de Yebra *et al.* 1993). También en humanos se ha reportado una sobreexpresión de ARNm de las proteínas nucleares con déficit en la cantidad

de proteína traducida correlacionado con infertilidad (Aoki *et al.* 2006b). Debido a que en esta investigación también se han observado valores sobreexpresados en *Prm2* y *Tnp1*, podríamos suponer que sucede algo parecido a lo reportado en humanos. Sin embargo, esta hipótesis es rechazada porque si hubiese menos protaminación en los espermatozoides, se hubiera logrado detectar mayor fragmentación del ADN en el grupo de ratones viejos debido a que el menor grado de protaminación espermática se ha relacionado fuertemente con la fragmentación del ADN (Aoki *et al.* 2005b). Si bien el aumento de la edad presentó diferencias significativas con los niveles de expresión de *Prm2* y *Tnp1*, esto no sería suficiente para ejercer algún impacto sobre la producción de ROS y el aumento de la fragmentación del ADN espermático, debido quizás al papel protagónico de *Prm1* en la protaminación espermática y cuyos niveles de expresión no son alterados en el grupo de ratones viejos. *Prm2* se sobreexpresaría debido a que su proteína P2, es la que proporciona mayor estabilidad al ADN uniéndose a 15 pb, mientras que P1 lo hace sólo a 10-11pb (Bench *et al.* 1996), por lo cual podría ser un evento positivo que ayude a mantener la integridad del ADN espermático en el grupo de ratones viejos o ser un cambio negativo con un efecto débil que se traduzca en la disminución de la movilidad espermática. Tanto P1 como P2 varían entre hombres fértiles e infértiles pero P2 cambia más que P1, lo que sugiere diferentes estabilidades para estas dos moléculas (Steger *et al.* 2008), esto quizás porque P1 se expresa en todos los mamíferos, mientras que P2 sólo en algunos (Corzett *et al.* 2002), sugiriendo una función más básica y conservada para P1 y una función más accesoria para P2. Ello explicaría porque en esta investigación se evidenció la sobreexpresión de *Prm2*, cuyo cambio de expresión no sería tan crítico como *Prm1*, este último punto se ha podido demostrar en humanos debido a que el nivel de expresión de *Prm2* no difirió significativamente entre hombres fértiles e infértiles, contrariamente a *Prm1* en los cuales sí difirió significativamente (Steger *et al.* 2003). Por lo tanto, las alteraciones en los niveles de expresión génica observadas en este estudio estarían relacionadas a la disminución de la movilidad espermática en el grupo de ratones viejos, sin embargo no tendría impacto sobre fenómenos relacionados con la protaminación espermática.



## 6. CONCLUSIONES

- El incremento de la edad disminuye la movilidad espermática en ratones.
- El incremento de la edad no incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), ni los niveles de fragmentación del ADN espermático, ni altera la protaminación espermática en ratones.
- Las alteraciones en los niveles de expresión génica observadas en este estudio están relacionadas a la disminución de la movilidad espermática en el grupo de ratones viejos, sin embargo no tuvo impacto sobre fenómenos relacionados con la protaminación espermática.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adham I, Nayernia K, Burkhardt-Göttges E *et al.* Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (*Tnp2*). Mol. Hum. Reprod. 2001. 7(6):513-20.

Adiga S, Upadhy D, Kalthur G *et al.* Transgenerational changes in somatic and germ line genetic integrity of first-generation offspring derived from the DNA damaged sperm. *Fertil. Steril.* 2010. 93(8):2486-90.

Adkins R, Thomas F, Tylavsky F *et al.* Parental ages and levels of DNA methylation in the newborn are correlated. *BMC Med. Genet.* 2011. 31: 12-47.

Agarwal A, Makker K & Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008. 59:2–11.

Aitken R & Clarkson J. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1987. 81:459-69.

Aitken R, De Iuliis G & McLachlan R. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int. J. Androl.* 2009. 32(1):46-56.

Aitken R, Gordon E, Harkiss D *et al.* Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1998. 59: 1037–46.

Aitken R & Sawyer D. The human spermatozoon – not waving but drowning. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003. 518:85-98.

Alfonso P & Kistler W. Immunohistochemical localization of spermatid nuclear transition protein 2 in the testes of rats and mice. *Biol. Reprod.* 1993. 48:522–9.

Alvarez J & Storey T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 1995. 42(3):334-46.

Alvarez J, Touchstone J, Blasco L *et al.* Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.* 1987. 8(5):338-48.

Aoki V & Carrell D. Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J. Androl.* 2003. 5:315–24.

Aoki V, Liu L & Carrell D. A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamina transcript retention in infertile human males with sperm protamina deficiency. *Mol. Hum. Reprod.* 2006b. 12:41–50

Aoki V, Liu L & Carrell D. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum. Reprod.* 2005a. 20:1298–306.

Aoki V, Liu L, Jones K *et al.* Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to IVF pregnancy rates and predictive of sperm fertilizing ability. *Fertil. Steril.* 2006a. 86:1408–15.

Aoki V, Moskovtsev S, Willis J *et al.* DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J. Androl.* 2005b. 26(6):741–8.

Armstrong D & Browne R. The analysis of free radicals, lipid peroxidases, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *In: Free Radicals in Diagnostic Medicine.* 1994. 366:43–58.

Armstrong J, Rajasekaran M, Chamulitrat W *et al.* Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 1999. 26(7-8):869–80.

Baird D, Collins J, Egozcue J *et al.* Fertility and ageing. *Hum. Reprod. Update.* 2005. 11:261–76.

Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 2007. 8(9):227.

Balhorn R, Corzett M, Mazrimas J *et al.* HPLC separation and partial characterization of human protamines 1, 2 and 3. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1987. 9(1):82–8.

- Balhorn R, Cosman M, Thornton K *et al.* Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm. In *The Male Gamete: From Basic Knowledge to Clinical Applications*, edited by Gagnon C. Vienna, IL: Cache River Press; 1999: 55-70.
- Balhorn R, Reed S & Tanphaichitr N. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia*. 1988. 44:52-5.
- Balhorn R, Weston S, Thomas C *et al.* DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Exp. Cell Res.* 1984. 150(2):298-308.
- Ballachey B, Evenson D & Saacke R. The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J. Androl.* 1988. 9:109-15.
- Ballachey B, Hohenboken W & Evenson D. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biol. Reprod.* 1987. 36:915-25.
- Banerjee A, Lang J, Hung M *et al.* Unfolded Protein Response is Required in nu/nu Mice Microvasculature for Treating Breast Tumor with Tunicamycin. *J. Biol. Chem.* 2011. 286(33): 29127-29138.
- Baskaran R & Rao M. Mammalian spermatid-specific protein TP2 with nucleic acids, in vitro. A comparative study with TP1. *J. Biol. Chem.* 1991. 265(34): 21039-47.
- Bedford J. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Reprod.* 1983. 28:108-20.
- Bellver J, Garrido N, Remohí J *et al.* Influence of paternal age on assisted reproduction outcome. *Reprod. Biomed. Online*. 2008. 17(5):595-604.
- Bench G, Friz A, Corzett M *et al.* DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry*. 1996. 23:263 - 271.

- Bennetts L & Aitken R. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 2005. 71: 77–87.
- Berrios M & Bedford J. Oocyte maturation: aberrant post-fusion responses of the rabbit primary oocyte to penetrating spermatozoa. *J. Cell Sci.* 1979. 39: 1–12.
- Bishop M. Ageing and reproduction in the male. *J. Reprod. Fertil.* 1970. Suppl. 12: 65–87.
- Boissonneault G. Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Lett.* 2002. 514:111–14.
- Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D *et al.* Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum. Reprod.* 2006. 21: 2876–81.
- Bosch M, Rajmil O, Egozcue J *et al.* Linear increase of structural and numerical chromosome 9 abnormalities in human sperm regarding age. *Eur. J. Hum. Genet.* 2003. 11:754–75.
- Bower P, Yelick P & Hecht N. Both P1 and P2 protamine genes are expressed in mouse, hamster and rat. *Biol. Reprod.* 1987. 37:479–88.
- Braun R, Peschon J, Behringer R *et al.* Protamine 30-untranslated sequences regulate temporal translational control and subcellular localization of growth hormone in spermatids of transgenic mice. *Genes Dev.* 1989. 3:793–802.
- Brewer L, Corzett M & Balhorn R. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J. Biol. Chem.* 2002. 277:38895–900.
- Buege J & Aust S. Microsomal lipid peroxidation methods. *Enzymol.* 1978. 52: 302 - 10.
- Bungum M, Humaidan P, Axmon A *et al.* Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum. Reprod.* 2007. 22:174–79.

- Caron N, Veilleux S & Boissonneault G. Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mol. Reprod. Dev.* 2001. 58:437–43.
- Carrell D, Emery B & Hammoud S. Altered protamina expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum. Reprod. Update.* 2007. 13:313–27.
- Carrell D & Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J. Androl.* 2001. 22:604–10.
- Castillo J, Simon L, de Mateo S *et al.* Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifuged sperm from infertile patients. *J. Androl.* 2011. 32(3):324–32.
- Chang Y, Lee-Chang J, Imam J *et al.* Interaction between microRNAs and actin-associated protein Arpc5 regulates translational suppression during male germ cell differentiation. 2012. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 10:109(15):5750–5.
- Chevallier P, Martinage A, Arkhis A *et al.* Protamine precursors in human spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.* 1990. 30:343–7.
- Cho C, Jung-Ha H, Willis W *et al.* Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol. Reprod.* 2003. 69:211–17.
- Cho C, Willis W, Goulding E *et al.* Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat. Genet.* 2001. 28:82–6.
- Clermont Y. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: a revised model for the renewal of spermatogonia. 1962. *Am. J. Anat.* 111:111–29
- Clermont Y, Oko R & Hermo L. Cell biology of mammalian spermiogenesis. *In Cell and Molecular Biology of the Testis*, ed. C Desjardins, LL Ewing. New York: Oxford Univ. Press. 1993. 1:332–76.
- Corzett M, Kramer Ch, Blacher R *et al.* Analysis of hamster protamines: Primary sequence and species distribution. *Mol. Reprod. Dev.* 1999. 54:273–82.

- Corzett M, Mazrimas J & Balhorn R. Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol. Reprod. Dev.* 2002. 61: 519–27.
- Crow J. Spontaneous mutation in man. *Mutat. Res.* 1999. 437(1): 5–9.
- Cummins J. Hyperactivated motility patterns of ram spermatozoa recovered from the oviducts of mated ewes. *Gamete Res.* 1982. 6:53–63.
- Davydov D. Microsomal monooxygenase in apoptosis: another target for cytochrome c signaling? *Trends Biochem. Sci.* 2001. 26:155–60.
- de Lamirande E & Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J. Androl.* 1992. 13:379–86.
- de Lamirande E, Leclerc P & Gagnon C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol. Hum. Reprod.* 1997. 3: 175–94.
- De la Rochebrochard E & Thonneau P. Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Hum. Reprod.* 2002. 17(6):1649–56.
- De La Rochebrochard E & Thonneau P. Paternal age  $\geq 40$  years: an important risk factor for infertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003. 189(4):901–5.
- Delisle J, Martignat L, Bach J *et al.* Bipotential mouse embryonic liver (BMEL) cells spontaneously express Pdx1 and Ngn3 but do not undergo further pancreatic differentiation upon Hes1 down-regulation. *BMC Research Notes.* 2008. 1(1): 136.
- De Yebra L, Ballesca J, Vanrell J *et al.* Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J. Biol. Chem.* 1993. 268: 10553–7.
- Enciso M, Sarasa J, Agarwal A *et al.* A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod. Biomed. Online.* 2009. 18(5):609–16.

- Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J *et al.* Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J. Androl.* 2006. 8:11–20.
- Eskenazi B, Wyrobek A, Slotter E *et al.* The association of age and semen quality in healthy men. *Hum. Reprod.* 2003. 18(2):447–54.
- Evenson D, Darzynkiewicz Z & Melamed M. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science.* 1980. 210: 1131–3.
- Evenson D & Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology.* 2006. 65(5):979–91.
- Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M *et al.* Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol. Reprod.* 2008.78(4):761–72.
- Fleming S, Green S, Hall J *et al.* Analysis and alleviation of male infertility. *Microsc. Anal.* 1995. 45:35–7.
- Flurkey K, Curren J & Harrison D. The Mouse in Aging Research. *In: The Mouse in Biomedical Research 2<sup>nd</sup> edition.* Fox J et al, editors. American College Laboratory Animal Medicine (Elsevier), Burlington, MA. 2007. pp. 637–72.
- Ford W. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum. Reprod. Update.* 2004. 10:387–99.
- Fraser L. Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation. *J. Exp. Zool.* 1977; 202:439–45.
- García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Oliver-Bonet M *et al.* Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil. Steril.* 2011. 95(1):105–9.
- Goovaerts I, Hoflack G, Van Soom A *et al.* Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. *Theriogenology.* 2006. 66: 323–30



Gorczyza W, Gong J & Darzynkiewics Z. Detection of DNA breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* 1993a. **53**: 1945–51.

Gorczyza W, Traganos F, Jesionowska H *et al.* Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp. Cell Res.* 1993b. 207:202–5.

Hamilton D & Naftolin F. *Basic Reproductive Medicine.* 1981. MIT Press, Cambridge, UK.

Hammiche F, Laven J, Boxmeer J *et al.* Sperm quality decline among men below 60 years of age undergoing IVF or ICSI treatment. *J. Androl.* 2011. 32(1):70–6.

Harbitz T. Morphometric studies of the Sertoli cells in elderly men with special reference to the histology of the prostate. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A. Pathol.* 1973. 81:703–17.

Hassan M & Killick S. Effect of male age on fertility: evidence for the decline in male fertility with increasing age. *Fertil. Steril.* 2003. 79 Suppl 3:1520–7.

Hazelton G & Lang C. Glutathione peroxidase and reductase activities in the aging mouse. *Mech. Ageing Dev.* 1985. 29:71–81.

Hecht N. Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *BioEssays.* 1998. 20:555–61.

Heidaran M, Showman R & Kistler W. A cytochemical study of the transcriptional and translational regulation of nuclear transition protein 1 (TP1), a major chromosomal protein of mammalian spermatids. *J. Cell Biol.* 1988. 106:1427–33.

Henkel R, Hajimohammed M, Stalf T *et al.* Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil. Steril.* 2004. 4:965–72.

Henkel R, Kierspel E, Hajimohammed M *et al.* DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproductive technology. *Reprod. Biomed. Online.* 2003. 7:477–84.

Holmes G, Bernstein C & Bernstein H. Oxidative and other DNA damages as the basis of aging: a review. *Mutat. Res.* 1992. 275:305–15.

Holstein A. Morphological evidence for the involution of spermatogenesis during senescence. *In Holstein AF (ed) Reproductive Biology and Medicine.* 1989. Diesbach, Berlin, Germany, pp 66–77.

Hurst L & Ellegren H. Sex biases in the mutation rate. *Trends Genet.* 1998. 14:446–52.

Iwasaki A & Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil. Steril.* 1992. 57:409–16.

Jervis K & Robaire B. Changes in gene expression during aging in the Brown Norway rat epididymis. *Exp. Gerontol.* 2002. 37:897–906.

Johnson L, Grumbles J, Bagheri A *et al.* Increased germ cell degeneration during postprophase of meiosis is related to increased serum follicle-stimulating hormone concentrations and reduced daily sperm production in aged men. *Biol. Reprod.* 1990. 42(2):281–7.

Johnson L, Petty C & Neaves W. Influence of age on sperm production and testicular weights in men. *J. Reprod. Fertil.* 1984. 70(1):211–8.

Kidd S, Eskenazi B & Wyrobek A. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil. Steril.* 2001. 75:237–48.

Kleene K. Patterns of translational regulation in the mammalian testis. *Mol Reprod Dev.* 1996. 43:268–81.

Kleinhaus K, Perrin M, Friedlander Y *et al.* Paternal age and spontaneous abortion. *Obstet Gynecol.* 2006. 108, 369–77.

- Kokkinaki M, Lee T, He Z *et al.* Age affects gene expression in mouse spermatogonial stem/progenitor cells. *Reproduction*. 2010. 139(6):1011-20.
- Kundu T & Rao M. Zinc dependent recognition of a human CpG island sequence by the mammalian spermatidal protein TP2. *Biochemistry*. 1996. 35:15626-32.
- Kwon T & Watts B. Malonaldehyde in aqueous solution and its role as a measure of lipid oxidation in foods. *Journal of Food Science*. 1964. 29:294-302.
- Lambert S, Masson P & Fisch H. The male biological clock. *World. J. Urol*. 2006. 24(6):611-7.
- Lee K, Haugen H, Clegg C *et al.* Premature translation of protamine 1 mRNA causes precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice. *Proc. Natl Acad. Sci*. 1995. 92: 12451-1245.
- Lefevre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F *et al.* Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Annals de Biologie Clinique*. 1998. 56(3):305-19.
- Leiter E, Premdas F, Harrison D *et al.* Aging and glucose homeostasis in C57BL/6J male mice. *FASEB Journal*. 1988. 2: 2807-11.
- Levesque D, Veilleux S, Caron N *et al.* Architectural DNA-binding properties of the spermatidal transition proteins 1 and 2. *Biochem. Biophys Res. Commun*. 1998. 252:602-9.
- Levitas E, Lunenfeld E, Weisz N *et al.* Relationship between age and semen parameters in men with normal sperm concentration: analysis of 6022 semen samples. *Andrologia*. 2007. 39:45-50.
- Levy S, Serre V, Hermo L *et al.* The effects of aging on the seminiferous epithelium and the blood-testis barrier of the Brown Norway rat. *J. Androl*. 1999. 20:356-65.
- Lewis J, Song Y, de Jong M *et al.* A walk though vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma*. 2003. 111:473-82.

- Lowe X, Collins B, Allen J *et al.* Aneuploidies and micronuclei in the germ cells of male mice of advanced age. *Mutat. Res.* 1995. 338:59–76
- Mali P, Kaipia A, Kangasniemi M *et al.* Stage-specific expression of nucleoprotein mRNAs during rat and mouse spermiogenesis. *Reprod. Fertil. Dev.* 1989. 1:369–82.
- McLay D & Clarke H. Remodeling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction.* 2003. 125(5):625–33
- McPherson S & Longo F. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur. J. Histochem.* 1993. 37:109–28.
- Meistrich M. Histone and basic nuclear protein transitions in mammalian spermatogenesis. *In: Histones and other basic nuclear proteins. Hnilica L, Stein G, Stein J, editors.* Orlando, FL: CRC Press. 1989. p 165–82.
- Meistrich M, Mohapatra B, Shirley C *et al.* Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma.* 2003. 111(8):483–8.
- Meistrich M, Trostle-Weige P & van Beek M. Separation of specific stages of spermatids from vitamin A-synchronized rat testes for assessment of nucleoprotein changes during spermiogenesis. *Biol. Reprod.* 1994. 51:334–44.
- Mitchell L, De Iuliis G & Aitken R. The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology. *Int. J. Androl.* 2011. 34(1):2–13.
- Miyagawa Y, Nishimura H, Tsujimura A *et al.* Single-nucleotide polymorphisms and mutation analyses of the TNP1 and TNP2 genes of fertile and infertile human male populations. *J. Androl.* 2005. 26(6):779–86.
- Morales E, Horn R, Pastor L *et al.* Involution of seminiferous tubules in aged hamsters: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative morphological study. *Histol. Histopathol.* 2004. 19:445–55.

- Morris I, Ilott S, Dixon L *et al.* The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum. Reprod.* 2002. 17:990–8.
- Morrison J, Coleman M, Aunan E *et al.* Aging reduces responsiveness to BSO- and heat stress-induced perturbations of glutathione and antioxidant enzymes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005. 289:1035–41.
- Moskovtsev S, Willis J, White J *et al.* Leukocytospermia: relationship to sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male factor infertility. *Fertil. Steril.* 2007. 88(3):737–40.
- Moussa F, Oko R & Hermo L. The immunolocalization of small nuclear ribonucleoprotein particles in testicular cells during the cycle of the seminiferous epithelium of the adult rat. *Cell Tissue Res.* 1994. 278(2): 127–34.
- Muratori M, Marchiani S, Maggi M *et al.* Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Front. Biosci.* 2006. 11:1491–99.
- Nasr-Esfahani M, Razavi S, Mardani M *et al.* Effects of failed oocyte activation and sperm protamine deficiency on fertilization post-ICSI. *Reprod. Biomed. Online.* 2007. 14(4):422–9
- Nasr-Esfahani M, Razavi S, Mozdarani H *et al.* Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. *Andrologia.* 2004a. 36(3):95–100.
- Nasr-Esfahani M, Salehi M, Razavi S *et al.* Effect of protamine-2 deficiency on ICSI outcome. *Reprod. Biomed. Online.* 2004b. 9(6):652–8.
- Nasr-Esfahani M, Salehi M, Razavi S *et al.* Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod. Biomed. Online.* 2005. 11: 198–205.

- Nybo Andersen A, Hansen K, Andersen P *et al.* Advanced paternal age and risk of fetal death: a cohort study. *Am. J. Epidemiol.* 2004. 160: 1214–22.
- Olds-Clarke P. The nonprogressive motility of sperm populations from mice with a t32 haplotype. *J. Androl.* 1983. 4:136–43.
- Oliva R & Dixon G. *In: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* Cohn. W & Moldave K, eds. 1991. 26-96, Academic Press, San Diego.
- Paniagua R, Amat P, Nistal M *et al.* Ultrastructure of Leydig cells in human ageing testes. *J. Anat.* 1986. 146: 173–83.
- Plas E, Berger P, Hermann M *et al.* Effects of aging on male fertility? *Exp. Gerontol.* 2000. 35:543–51.
- Rebrin I, Bayne A, Mockett R *et al.* Free aminothiols, glutathione redox state and protein mixed disulphides in aging *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.* 2004. 382:131–6
- Ren D, Navarro B, Perez G *et al.* A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature.* 2001. 413:603–9.
- Russell L, Ettlin R, Sinha A *et al.* Mammalian Spermatogenesis. *In: Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. St. Louis: Cache River Press.* 1990. Pp 119–161.
- Sakata Y, Saegusa H, Zong S *et al.* Ca<sup>v</sup>2.3 (alpha1E) Ca<sup>2+</sup> channel participates in the control of sperm function. *FEBS Lett.* 2002. 516:229–33.
- Santiso R, Muriel L, Goyanes V *et al.* Evidence of modified nuclear protein matrix in human spermatozoa with fragmented deoxyribonucleic acid. *Fertil. Steril.* 2007. 87(1):191–4.
- Sanz N, Diez-Fernandez C, Alvarez A *et al.* Age-dependent modifications in the rat hepatocyte antioxidant defense systems. *J. Hepatol.* 1997. 27:525–34.
- Sartorelli E, Mazzucatto L & Pina-Neto J. Effect of paternal age on human sperm chromosomes. *Fertil. Steril.* 2001. 76:1119–23.

- Sartorius G & Nieschlag E. Paternal age and reproduction. *Hum. Reprod. Update.* 2010. 16(1):65-79.
- Schmid T, Eskenazi B, Baumgartner A *et al.* The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum. Reprod.* 2007. 22:180-7.
- Serre V & Robaire B. Paternal age affects fertility and progeny outcome in the Brown Norway rat. *Fertil. Steril.* 1998a. 70:625-31.
- Serre V & Robaire B. Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. *Biol. Reprod.* 1998b. 58:497-513.
- Shaman J & Ward W. Sperm chromatin Stability and Susceptibility to Damage in Relation to Its Structure. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 2006.
- Sharpe R. Regulation of spermatogenesis. *In The Physiology of Reproduction.* ed. Knobil E & Neill J. 1994. 1:1363-434.
- Shi Q & Martin R. Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. *Cytogenet. Cell Genet.* 2000. 90(3-4):219-26.
- Shih D & Kleene K. A study by in situ hybridization of the stage of appearance and disappearance of the transition protein 2 and the mitochondrial capsule seleno-protein mRNAs during spermatogenesis in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 1992. 33:222-7.
- Shirley C, Hayashi S, Mounsey S *et al.* Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol. Reprod.* 2004. 71(4):1220-9.
- Singh N, Danner D, Tice R *et al.* Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp. Cell. Res.* 1989. 184: 461-70.
- Singh N, Muller C & Berger R. Effects of age on DNA doubles strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil. Steril.* 2003. 80: 1420-30.

- Slama R, Bouyer J, Windham G *et al.* Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion. *Am. J. Epidemiol.* 2005. 161: 816–82.
- Sloter E, Nath J, Eskenazi B *et al.* Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents. *Fertil. Steril.* 2004. 81:925–94.
- Smith R, Kember R, Mill J *et al.* Advancing paternal age is associated with deficits in social and exploratory behaviors in the offspring: a mouse model. *PLoS One.* 2009. 30:4(12):8456-61
- Spadafora C. Sperm-mediated-reverse gene transfer: A role of reverse transcriptase in the generation of new genetic information. *Hum. Reprod.* 2008. 23: 735–40.
- Spano M, Bonde J, Hjøllund H *et al.* Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil. Steril.* 2000. 73:43–50.
- Steger K. Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat. Embryol.* 2001. 5: 323–34.
- Steger K, Failing K, Klonisch T *et al.* Round spermatids from infertile men exhibit decreased protamine-1 and -2 mRNA. *Hum. Reprod.* 2001. 4:709–16.
- Steger K, Fink L, Failing K *et al.* Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertilemen. *Mol. Hum. Reprod.* 2003. 9(6):331-6.
- Steger K, Wilhelm J, Konrad L *et al.* Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum. Reprod.* 2008. 23(1):11-6.
- Stern H. The process of meiosis. In *Cell and Molecular Biology of the Testis*, ed. C Desjardins, LL Ewing. New York: Oxford Univ. Press. 1993. 1:296–331.



- Tanemura K, Kurohmaru M, Kuramoto K *et al.* 1993. Age-related morphological changes in the testis of the BDF1 mouse. *J. Vet. Med. Sci.* 55:703–10.
- Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N *et al.* Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp. Cell Res.* 1978. 117(2): 347–56.
- Templeton A. Infertility-epidemiology, aetiology and effective management. *Health Bull. (Edinb).* 1995. 53:294–8.
- Tesarik J, Mendoza-Tesarik R & Mendoza C. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod. Biomed. Online.* 2006. 12:715–21.
- Torregrosa N, Domínguez-Fandos D, Camejo M *et al.* Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum. Reprod.* 2006. 21(8):2084–9.
- Tsitouras P. Effects of age on testicular function. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 1987. 16: 1045–59.
- Vagnini L, Baruffi R, Mauri A *et al.* The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod. Biomed. Online.* 2007. 15(5):514–9.
- Viger R & Robaire B. Gene expression in the aging Brown Norway rat epididymis. *J. Androl.* 1995.16:108–17.
- Villani P, Eleuteri P, Grollino M *et al.* Sperm DNA fragmentation induced by DNase I and hydrogen peroxide: an in vitro comparative study among different mammalian species. *Reproduction.* 2010. 140(3):445–52.
- Villegas J, Kehr K, Soto L *et al.* Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. *Andrologia.* 2003. 35:227–32.
- Virro M, Larson-Cook K & Evenson D. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and

ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil. Steril.* 2004. 81:1289–95.

Walter C, Intano G, McCarrey J *et al.* Mutation frequency declines during spermatogenesis in young mice but increases in old mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. 95:10015–9

Wang C, Leung A & Sinha-Hikim A. Reproductive aging in the male brown-Norway rat: a model for the human. *Endocrinology.* 1993. 133:2773–81

Ward W, Partin A & Coffey D. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma.* 1989. 98:153–9.

Wei Y & Lee H. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp. Biol. Med.* 2001. 227:671–82.

Whitcomb B, Turzanski-Fortner R, Richter K *et al.* Contribution of male age to outcomes in assisted reproductive technologies. *Fertil. Steril.* 2011. 95(1):147–51.

Wouters-Tyrou D, Martinage A, Chevaillier P *et al.* Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie.* 1998. 80:117–28.

Wu J, Ribar T, Cummings D *et al.* Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nat. Genet.* 2000. 25:448–52.

Wyrobek A, Eskenazi B, Young S *et al.* Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2006. 103:9601–6.

Yanagimachi R. Mammalian fertilization. *In: The Physiology of Reproduction.* 2nd edn. Knobil E. & Neill J eds, Raven Press, New York. 1994. pp. 189–317.

Yanagimachi R. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J. Reprod. Fertil.* 1970. 23:193– 6.

- Yelick P, Balhorn R, Johnson *et al.* Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine I is not. *Mol. Cell. Biol.* 1987. 7:2173-9.
- Yu Y, Zhang Y, Unni E *et al.* Meistrich M. Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. 97:4683-8.
- Zhang Y, Kreger B, Dorgan J *et al.* Parental age at child's birth and son's risk of prostate cancer. The Framingham Study. *Am. J. Epidemiol.* 1999. 150(11):1208-12.
- Zhao M, Shirley C, Hayashi S *et al.* Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis.* 2004a. 38:200-13.
- Zhao M, Shirley C, Mounsey S *et al.* Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. *Biol. Reprod.* 2004b. 71(3):1016-25.
- Zhao M, Shirley C, Yu Y *et al.* Targeted disruption of transition protein 2 gene affects spermatogenesis in mice. *Mol. Cell. Biol.* 2001. 21:7243-755.
- Zini A & Libman J. Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. *Curr. Opin. Urol.* 2006. 16:428-34.
- Zirkin B & Chen H. Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biol. Reprod.* 2000. 63: 977-81.
- Zirkin B & Strandberg J. Quantitative changes in the morphology of the aging canine prostate. *Anat. Rec.* 1984. 208: 207-14.
- Zubkova E & Robaire B. Effects of ageing on spermatozoal chromatin and its sensitivity to in vivo and in vitro oxidative challenge in the Brown Norway rat. *Hum. Reprod.* 2006. 21(11):2901-10.
- Zubkova E & Robaire B. Effect of glutathione depletion on antioxidant enzymes in the epididymis, seminal vesicles, and liver and on spermatozoa motility in the aging brown Norway rat. *Biol. Reprod.* 2004. 71:1002-08.

Zubkova E, Wade M & Robaire B. Changes in spermatozoal chromatin packaging and susceptibility to oxidative challenge during aging. *Fertil. Steril.* 2005. 84 Suppl 2:1191-8.